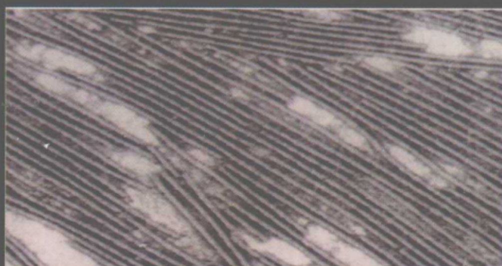
雪菜病毒病及其防治

周书军　施曼玲　主编







中国农业科学技术出版社

责任编辑：徐平丽
封面设计：马　钢
策　　划：叶培根

ISBN 978-7-80233-579-0



定价：30.00元

S

雪菜病毒病及其防治

周书军　施曼玲　主编

中国农业科学技术出版社

图书在版编目（CIP）数据

雪菜病毒病及其防治/周书军，施曼玲主编．—北京：中国农业科学技术出版社，2008.5
ISBN 978-7-80233-579-0

Ⅰ．雪…　Ⅱ．①周…②施…　Ⅲ．雪里蕻-植物病毒病-防治
Ⅳ．S436.344

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2008）第 053971 号

责任编辑　徐平丽
责任校对　贾晓红　康苗苗

出 版 者　中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号　邮编：100081
电　　话　(010) 68919704（发行部）(010) 62189014（编辑室）
(010) 68919703（读者服务部）
传　　真　(010) 68975144
网　　址　http://www.castp.cn
经 销 者　新华书店北京发行所
印 刷 者　北京富泰印刷有限责任公司
开　　本　889 mm×1 194 mm　1/32
印　　张　5.375
字　　数　150 千字
版　　次　2008 年 5 月第 1 版　2008 年 5 月第 1 次印刷
定　　价　30.00 元

版权所有・翻印必究

序

植物病毒是危害农作物的一种重要病害病原，它具有生物的基本特性，又具有化学大分子的物质特性，纯化后可以形成结晶，独立存在于空气、土壤或水中。遇到合适的寄主，就能通过一定的传播途径侵入寄主细胞。病害一旦发生就很难根治，严重影响了农作物的产量和品质，造成重大的经济损失。鉴于植物病毒病防治上的困难及其所造成的危害，因此常常被称作是植物的“癌症”。

病毒的种类很多，据统计，目前被国际病毒分类委员会（ICTV）所承认的植物病毒已达15科、72属，共909种，其危害也越来越严重，尤其是靠无性繁殖的作物，如利用茎（块茎、球茎、鳞茎、根茎、匍匐茎）、根（块根、宿根）、枝、叶、芽（顶芽、侧芽、球芽、不定芽）等通过嫁接、分株、扦插、压条等途径来进行繁殖的作物受害最为严重。水果中的苹果、葡萄、草莓，花卉中的百合、唐菖蒲、水仙、郁金香、香石竹、菊花，蔬菜中的马铃薯、姜和雪菜、大白菜一类的十字花科蔬菜等，因病毒侵染所致的病毒病都已成为主要病害，轻则减产，重则绝收。

宁波市是浙江雪菜的主要产区，宁波市的鄞州区和宁海、慈溪、余姚等县市农民素有种植、腌制销售雪菜的习惯，雪菜产业是农民增收致富的一个重要生产项目。然而在20世纪，特别是80~90年代，雪菜产业一直受

到雪菜病毒病的困扰。鄞州区传统品种邱隘黄叶和乌叶、宁海县的传统品种宁海花叶几乎年年发病，常年发病率都在20%～30%，重病年达70%～80%，使菜农与雪菜加工企业蒙受了重大损失，一度成为制约雪菜行业发展的瓶颈。

21世纪初，宁波市的一批农业科技人员在宁波市（鄞州区、宁海县）科委、浙江省农业基金会宁波执行部和鄞州区执行部的大力扶持下，联手合作决心突破雪菜病毒病防治这一难题。2003年6月由宁波市鄞州区绿原雪菜开发研究中心与浙江大学生物技术研究所的专家达成共识，合作进行了《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》课题的研究。至2006年5月，已基本完成预定的研究任务，取得一定成效。现在，雪菜病毒病在宁波市鄞州区肆虐的局面已不复见，雪菜病毒病的危害已基本得到控制。

《雪菜病毒病及其防治》一书，是该项目的直接参加者的工作经验总结，是病毒理论研究与生产实践相结合的结晶。它的出版既体现了从事病毒学研究和参与《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》课题实践的专家、教授、农业技术推广工作者的工作成果，同时也是浙江省农业基金会宁波市执行部与鄞州区执行部本着“为基层农技站服务，支持农技推广事业的办会宗旨”给予大力扶助的工作业绩，我们做了自己应做的工作，同时也为我们取得的业绩感到高兴。

本书学术性较强，根据病毒学研究理论所总结的雪菜病毒病防治对策可信可用，是一部较有水平的学术著作，也是一本可供直接从事雪菜生产的农业技术人员、

专业户和雪菜加工企业参考应用的科普读本、生产技术读本。

愿本书的出版能在推动农业科学技术的普及与发展中起到促进作用。

俞舜民

2008 年 5 月 1 日

（俞舜民同志原系宁波市鄞县人民政府农业副县长、高级农艺师，退休后现任浙江省农业技术推广基金会宁波市鄞州区执行部会长）

前 言

雪菜病毒病是一种危害性极大的雪菜病害，染病植株，由皱叶卷缩逐步全株枯死。在宁波地区，常年发病率达20%～30%，严重时达到70%～80%，菜农因此而减产减收，雪菜加工企业因此而影响原料的采购与正常的加工生产，并严重影响加工产品质量。

21世纪初，宁波市的一批农业科技人员在宁波市（鄞州区、宁海县）科委、浙江省农业基金会宁波执行部和鄞州区执行部的大力扶持下，联手合作决心突破雪菜病毒病防治这一难题。2003年6月由宁波市鄞州区绿原雪菜开发研究中心与浙江大学生物技术研究所的专家达成共识，决定合作开展《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》课题的研究，至2006年5月已基本完成预定的研究任务，取得了一定成效。项目研究基本查明了雪菜病毒病的病毒类型、传播途径和发病规律，并通过试验与多点考核，系统地提出了防治病毒病的技术措施，经宁波市鄞州区雪菜协会在区内各雪菜加工企业的生产基地组织实施，均取得了较为良好的防治效果。雪菜病毒病在雪菜产区普发的现象已得到有效控制。

本着科技成果应转化为生产力，在更大范围内发挥其作用的原则，参加项目研究的科技人员，决定对已取得的研究成果进一步提升、深化，从理论与实践上阐明雪菜病毒病发生与发展的规律及其防治原则，我们的愿望得到了浙江省农业技术推广基金会宁波市执行部和鄞

州区执行部的支持，除在鄞州区继续进行雪菜病毒病课题的研究实践外，同时出版本书，以求抛砖引玉，对雪菜生产能起更好的促进作用。

本书共分 7 章，包括综述、植物病毒的基本特征、雪菜病毒病的诊断和病毒鉴定、芜菁花叶病毒的特征、雪菜病毒的传播、选育并推广抗（耐）病品种、综合防治雪菜病毒病的其他措施等内容。全书约 15 万字，由宁波市鄞州区农业技术服务站周书军高级农艺师和杭州师范大学施曼玲教授主编，张昌杰副主编，本书相关的研究工作还得到浙江省自然科学基金（Y305090）资助。这是我国首部论述雪菜病毒病及其防治的专著，可供各级相关农业科技人员参考之用。

由于编写时间局促，并限于水平，书中错误在所难免，敬请读者谅解。

编者

2008 年 5 月 1 日

目　录

第一章　综　述 …………………………………… (1)
第一节　雪菜的起源与分布 …………………………… (1)
第二节　雪菜的主要类型特点及雪菜生产现状 ……… (3)
第二章　植物病毒的基本特征 ………………………… (6)
第一节　植物病毒研究简史 …………………………… (6)
第二节　植物病毒的基本形态、结构和组成 ………… (7)
第三节　植物病毒的复制和增殖 …………………… (13)
第三章　雪菜病毒病的诊断和病毒鉴定 …………… (17)
第一节　植物病毒病诊断的原则和方法 …………… (17)
第二节　芜菁花叶病毒病的诊断与病毒鉴定 ……… (25)
第三节　宁波雪菜花叶病毒病病原的检测与鉴定 … (30)
第四章　芜菁花叶病毒的特征 ……………………… (43)
第一节　芜菁花叶病毒的普通生物学特征 ………… (43)
第二节　芜菁花叶病毒的分子生物学特征 ………… (50)
第五章　雪菜病毒的传播 …………………………… (70)
第一节　雪菜病毒的介体和非介体传播 …………… (70)
第二节　雪菜病毒的侵染途径 ……………………… (76)
第三节　影响雪菜病毒侵染的因素 ………………… (78)
第四节　雪菜受病毒侵染后的变化 ………………… (85)
第六章　选育并推广抗（耐）病品种 ……………… (88)
第一节　品种对病毒的抗性 ………………………… (88)
第二节　育种目标与育种方式 ……………………… (101)
第三节　强耐雪菜病毒病品种选育案例 …………… (104)

第七章　综合防治雪菜病毒病的其他措施 …………………（121）
第一节　切断传毒媒介 ……………………………………（121）
第二节　适当推迟播期，避开蚜虫危害高峰 ……………（125）
第三节　改进栽培管理，改善生态环境 …………………（127）
第四节　采用积极的、物理的及化学的防治方法 ………（130）
第五节　应用雪菜抗病毒基因工程 ………………………（134）
主要参考文献 ……………………………………………（145）

第一章 综 述

第一节 雪菜的起源与分布

一、雪菜的起源

雪菜的祖先是芥菜，芥菜（*B. juncea* Coss.）是小亚细亚和伊朗起源的黑芥（*B. nigra* Koch.，x=8）与地中海沿岸起源的芸薹（*B. campestris* L.，x=10）杂交形成的异源四倍体植物。据考证：芥菜传入中国已有5 000~6 000年历史（公元前4155年至公元前3535年西安半坡遗址中就已有应用芥菜的史实），公元前1 000多年西周初期起已有应用芥菜的文字记载。在漫长的历史过程中，芥菜在中国演化出根芥菜（var. *megarrhiza* Tsen et Lee）、茎芥菜（var. *tsatsai* mao）、叶芥菜（var. *foliosa* Bailey）、薹芥菜（var. *scaposus* li）、芽芥菜（var. *gemmifera* Lin et Lee.）和子芥菜（var. *scelerata* Li）等6个变种，其中叶芥菜中又分离产生雪菜这一分蘖芥的一个变种。

雪菜喜冷凉、较耐寒，它对低温有一定适应能力，能耐-5℃的低温；一生耗水较多；要求有较充足的光照；对土壤pH值要求不严格，从长有杜鹃、松、槠等酸性指示植物的山地、微酸性的水稻田，到长有棉花和长有单叶蔓荆、蟛蜞菊之类碱性指示植物的围垦海涂地均能生长。但由于其根系发达且分布较浅，单位面积产量较高，因此，要求种植的土壤以土层深厚、土质肥沃、排水良好、保肥、保水力强的黏性壤土或沙质壤土为好，低洼地不宜种植。

二、雪菜的分布

我国雪菜主要分布在长江流域各省、市，即东经 90°33′ ~ 122°25′，北纬 24°30′ ~ 35°45′，包括 15 个省（青海、云南、贵州、四川、甘肃、陕西、河南、湖北、湖南、江西、安徽、江苏、浙江、广东、福建）、2 个自治区（西藏、广西）和 2 个直辖市（上海、重庆）的全部或部分地区。

浙江省是我国雪菜的主产区，全省种植面积近 40 万亩，特别是在宁波地区种植面积很大，常年种植面积一般多在 6 万 ~ 10 万亩。其中，尤以鄞州区为“最”，不仅栽培面积最大，而且栽培的历史最为悠久，据考证：明末代诗人、鄞州人屠本畯（1573 ~ 1620）在其所著的《野菜笺》一书中就已记曰：“四明有菜名雪里甕（蕻），头昔蓄珍莫比雪深，诸菜冻欲死，此菜青青蕻尤美”；清人汪灏在他所著的《广群芳谱》中也曾写道：“四明有菜，名雪里蕻。雪深诸菜冻损，此菜独青”；清光绪《鄞县志》中李邺嗣的《贸东竹枝》词中也记有：“翠绿新蕹滴醋红，嗅来香气嚼来松，纵然金菜琅蔬好，不及我乡雪里蕻”等赞咏雪菜的诗句。根据这些资料，大体可以认定在鄞州一带种植雪菜至少已有 500 余年的历史。

雪菜的食用部分是通过盐渍加工后的茎叶，在宁波素有“咸鸡”之美称。“咸鸡”可炒、煮、烤、炖、蒸、拌或作配料、汤料、包馅均为上品；“笋丝雪菜”、“雪菜黄鱼”是宁波的地方名菜。同时由于“咸鸡”微酸，利于生津开胃，在炎夏酷暑，“咸鸡汤”是宁波人极为普通的家常汤料。宁波人有句俗话：“三日不吃咸菜汤，两脚感到酸汪汪”，形象地刻画了宁波人对咸菜的爱好。

第二节 雪菜的主要类型特点及雪菜生产现状

一、雪菜的主要类型特点

我国雪菜地方品种很多，仅宁波市鄞州区绿原雪菜开发研究中心搜集的就有 70 多个，叶色有深有淡，成熟有早有迟，叶形各不相同。其分类方法多种，按抽薹迟早，可分为早熟种与迟熟种；按叶色可分为乌叶种和黄叶种、半黄叶种（或称半乌叶种）；按叶缘有无缺刻及其缺刻程度来进行区分，基本上可分为三大类型即板叶型、花叶型、细叶型。

板叶型的代表品种有宁波邱隘的黄叶种、乌叶种、上海加长种、上海牛肚雪菜；细叶型的代表品种有嵊州九头芥、浦江九头芥、东阳九头芥等；花叶型的代表品种有临海花菜、宁海花菜。浙江的嘉兴、湖州、宁波市鄞州区一带和江苏、四川成都等地习惯种植板叶型品种；浙江的绍兴、天台、金华、富阳、宁波的北仑区和湖南、湖北、江西等省则多以细叶型雪菜为主；浙江的温岭、宁海则多栽培花叶型雪菜。

板叶型雪菜的主要特点是：叶片为板叶，分蘖强、产量高。此类雪菜按其叶色又可分为乌叶、黄叶与半黄叶。雪菜腌制成品率一般在 70% 左右。

细叶型雪菜的主要特点是：叶细碎、梗重于叶，腌制成品率一般在 75% ~80%。腌制后可直接食用，也可晒制梅干菜。

花叶型雪菜的特点是：叶缘缺刻较深，但不细裂，梗较粗，产量高，品质欠佳，腌制成品率介于板叶型雪菜与细叶型雪菜之间。

二、雪菜生产现状

（一）经济效益好，种植、腌制、加工已形成产业链

浙江省是雪菜的主要产区，常年雪菜的种植面积约有 30 万

亩，宁波市常年栽培面积6万~10万亩。鄞州区是宁波市雪菜的主产地之一，常年种植面积在2万亩左右，按亩产3 500kg左右，每千克鲜菜收购价0.3元计算，亩产值在千元以上，全区鲜雪菜总产6万t，产值1 800万元；改革开放以来，鄞州区的雪菜生产快速发展，由过去的单纯的盐渍加工，发展成为精加工、小包装，并开发了美味雪菜、笋丝雪菜、油炸雪菜、雪菜原汁等品种，极大地提高了雪菜及其腌制品的附加值，为雪菜产业的发展开拓了新路。至2003年年底，鄞州区雪菜加工企业已遍地开花，至今已发展到23家，年加工雪菜可达1.68万t，加工后全区的雪菜总产值达到8 000万元。目前，雪菜的种植、腌渍、加工已形成一条产业链，如宁波市鄞州三丰可味食品有限公司已建立250亩以雪菜、高菜为主的特种蔬菜核心基地和近3 000亩生产基地。以直接经营或委托农户承包经营生产雪菜、高菜，就地腌制，然后按订单收购，加工成美味雪菜、笋丝雪菜、金菇高菜等产品，产品除销往宁波、杭州、上海、广州、北京等大中城市外，还远销港澳地区，经济效益很好，2007年年产值达到1 560万元；鄞州区的宁波引发绿色食品有限公司，也有生产基地，有腌制加工点，雪菜腌制品加工花色多样、质量上乘，多次被评为省、市名牌产品，深受省内外客户好评，不仅国内畅销，而且远销澳大利亚及美国等国家。雪菜产业链的形成和发展对推动产地农村经济的发展起了重要作用。

（二）制约生产发展的主要问题

当前雪菜生产存在的主要问题是主产地传统品种退化、抗病能力下降，雪菜病毒病逐年加重。近几年雪菜病毒病在浙江宁波地区的常年发病率都在20%~40%，严重年份可达70%~80%，甚至全田绝收。植株发病后不仅产量显著降低，而且有病植株与健康植株一起加工时，还会严重影响雪菜加工的质量，使产品色味变差。目前，雪菜病毒病已发展成为浙江省雪菜生产的主要制约因素，严重阻碍了雪菜产业的持续发展。多年实践证明，雪菜病毒病的发生受多因子制约：气候影响是不可忽视的诱导因素，

干旱年份容易发病；种植品种单一、退化则是关键的内因；栽培措施是否合理恰当，也是决定病毒病发病率高低的一个重要因素。

寄主对病毒的抗性类型有感病、免疫、抗病、耐病及过敏性坏死。病毒不能侵入或侵染后病毒没有增殖、病毒复制量极少，不能导致严重的病状，这类品种叫抗病品种。品种的抗性都由一定的基因所调控，它们在杂交过程中能按一定的规律遗传给后代。不过有的抗性基因则往往与不良的农艺性状相互关联。因此在抗病育种中，首先要了解作物品种对病毒的抗性，在此基础上通过与农艺性状好的品种进行杂交组合，选育出可以在生产上广泛应用的优质高产抗病品种。目前，生产上大面积种植的雪菜品种产量高，但抗病性普遍较差；而一些地方品种虽然抗病性较好，但因农艺性状较差而无法在生产上大面积推广。

因此，培育抗病毒雪菜品种，同时探索农业综合防治技术措施是控制雪菜病毒病的发生与危害，持续发展浙江省雪菜产业的根本所在。

第二章　植物病毒的基本特征

第一节　植物病毒研究简史

病毒是一种专性寄生在活细胞内，只含核酸和蛋白质的非细胞微生物，又称分子生物，也是迄今为止人们在超微世界里所认识的最小生物之一。它具有生物的基本特性，又具有化学大分子的物质特性，纯化后可以形成结晶，独立存在于空气、土壤或水中。遇到合适的寄主，就能通过一定的传播途径侵入寄主细胞。一旦发生就很难根治，严重影响了农作物的产量和品质，造成重大的经济损失。鉴于植物病毒病防治上的困难及其所造成的危害，植物病毒病常被称作是植物的“癌症”。

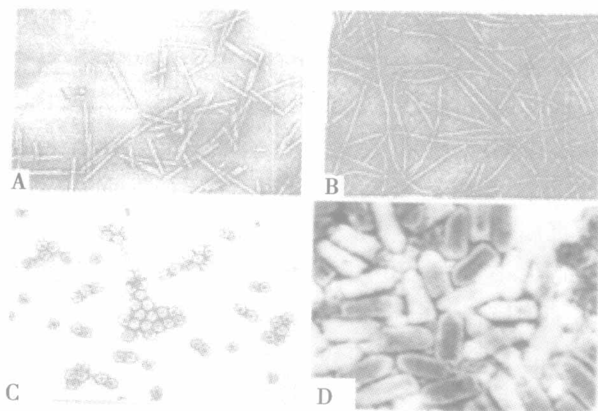
有关植物病毒病的最早记载可一直追溯到公元 752 年一首日本诗歌所描绘的，后来被证实由一种双生病毒引起的林泽兰黄化病。16 世纪和 17 世纪在荷兰兴起的杂色郁金香热，这举世闻名的、美丽的荷兰杂色郁金香，实际上就是由郁金香杂色病毒造成。历史上对植物病毒病的真正研究始于 19 世纪后期，1886 年德国的 Mayer 在荷兰发现烟草上出现深浅相间的绿色区域，称为烟草花叶病。1892 年俄国 Ivanowski 研究证实烟草花叶病株的汁液能够通过细菌过滤器并能传染健康植株。1898 年荷兰的 Beijerinck 证实这种病原能通过琼脂凝胶扩散，认为这种病原不是细菌，并提出了“filterable virus”一词。1935 年 Stanley 从烟草花叶病叶中提取出病毒结晶，1935～1937 年英国的 Bawden 和 Pirie 证实了该病毒结晶是一种核蛋白。1939 年，德国的 Kausche、Pfankuch 和 Ruska 应用电子显微镜第一次看到了烟草花叶病毒粒子的形态。1953 年 Luria 撰写了第一本“General Virology”（《普

通病毒学》)，1955 年第一卷“Journal of Virology”（《病毒学杂志》）出版，正式拉开了现代病毒学的研究序幕。

第二节　植物病毒的基本形态、结构和组成

一、植物病毒的基本形态

绝大多数病毒是能通过细菌过滤器的微小颗粒，它是非细胞生物，故单个病毒体不能称为“单细胞”，而称病毒粒子或病毒颗粒。病毒粒子可用化学沉淀、等电点沉降及超速离心等步骤提纯后用于电镜观察。也可直接用发病植物组织为材料进行超薄切片，再在电镜下观察。大部分植物病毒粒子的形态为球状、杆状和线状，少数为弹状、杆菌状和双联体状等（图 2－1）。



A. 杆状：20～80 nm×100～250 nm；B. 线状：10～13 nm×480～2 000 nm；C. 球状：20～35 nm，少数 70～80 nm；D. 弹状：170～380 nm×55～100 nm

图 2－1　不同植物病毒粒子的电镜照片

球状病毒的直径一般为 20～35 nm，少数可以达到 70～80 nm。球状病毒也称为二十面体病毒或多面体病毒或等轴状病毒。直径 30 nm 左右的球状植物病毒包括单分体的伴生病毒科、番茄丛矮病毒

科、黄症病毒科、芜菁黄花叶病毒属、南方菜豆花叶病毒属、玉米雷亚朵非纳病毒属，二分体的豇豆花叶病毒科、双分病毒科以及悬钩子病毒属，三分体的黄瓜花叶病毒属、雀麦花叶病毒属、等轴不稳环斑病毒属。另外还有直径大于 50 nm 球状植物病毒，如花椰菜花叶病毒科中的花椰菜花叶病毒属等 4 个属、番茄斑萎病毒属、呼肠孤病毒科中的植物呼肠孤病毒属等 3 个属。

杆状病毒大小多为 20 ~ 80 nm × 100 ~ 250 nm，两端平齐，少数两端钝圆。杆状病毒粒子刚直，不易弯曲。包括单一长度的烟草花叶病毒属，2 种长度短杆状粒子的烟草脆裂病毒属、真菌传杆状病毒属、花生丛簇病毒属，3 种或 3 种以上长度杆状粒子的大麦病毒属、马铃薯帚顶病毒属和甜菜坏死黄脉病毒属等。

线状病毒大小为 10 ~ 13 nm × 480 ~ 2 000 nm，两端平齐，粒体具不同程度的弯曲。病毒粒子呈柔软弯曲或较直的螺旋对称线状，包括马铃薯 Y 病毒科和长线形病毒科，以及马铃薯 X 病毒属、纤毛病毒属、葡萄病毒属、发形病毒属、青葱 X 病毒属、麝香石竹潜隐病毒属、凹陷病毒属等。

杆菌状病毒两端钝圆，大小处于杆状病毒的大小范围内。包括水稻东格鲁杆状病毒属、杆状 DNA 病毒属、油橄榄病毒属、苜蓿花叶病毒属、欧尔密病毒属等。

弹状病毒大小多为 170 ~ 380 nm × 55 ~ 100 nm，弹状，如弹状病毒科的细胞质弹状病毒属和细胞核弹状病毒属。

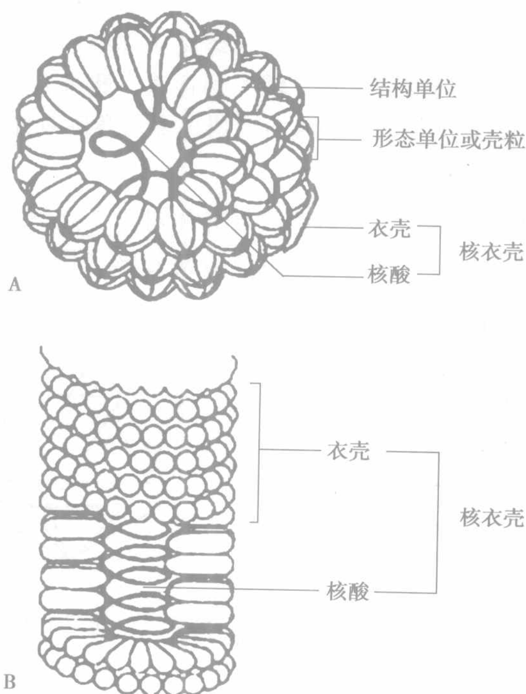
双联病毒也称双生病毒，病毒粒子大小为 18 nm × 30 nm，貌似由 2 个球形（或多面体）粒子连在一起。包括双生病毒科的玉米线条病毒属、曲顶病毒属、菜豆金色花叶病毒属。

细丝状病毒形状呈螺旋状、环状细丝或分枝状，如纤细病毒属、蛇形病毒属。

二、植物病毒的结构

病毒主要由衣壳和核酸二部分构成，衣壳和核酸统称为核衣壳（图 2－2）。核酸位于病毒粒子的中心，衣壳围绕住核酸的周

围，对核酸起保护作用。有些复杂的病毒在核衣壳外还有一层由类脂或脂蛋白组成的外套称为包膜，有的包膜上还有刺突等附属物。病毒的衣壳也称外壳蛋白，是由核酸所编码。衣壳的化学成分是蛋白质，由称为衣壳粒的亚单位组成。衣壳粒是电镜下能见的最小形态学单位，由一种或多种肽链折叠而成。由于衣壳粒在衣壳上的不同排列方式，病毒具有下列3种形态结构。



A. 等轴对称；B. 螺旋对称

图2－2　植物病毒两种主要对称结构

（一）螺旋对称

螺旋对称结构的病毒其衣壳由衣壳粒有规律地沿着中心轴呈螺旋排列而成，核酸存在衣壳内侧的螺旋状沟中，这种构造使核

酸与蛋白质亚基间的接触更为紧密。具有这种对称体制的病毒多数是单链 RNA 病毒，在电镜下其粒子形态为线状、直杆状和弯曲杆状。烟草花叶病毒是螺旋对称的典型代表（图 2－3），烟草花叶病毒的杆状衣壳由 2 130个衣壳粒以右手螺旋排列而成，约有 130 个螺旋，螺距为 2. 35 nm，衣壳全长约 300 nm。病毒的 RNA 链以螺旋形状盘绕在蛋白亚基之中，离中心轴距离为 4 nm，每个蛋白亚基结合有 3 个核苷酸，RNA 完全被包被。除了烟草花叶病毒属等 8 个杆状病毒属的病毒为螺旋对称结构以外，马铃薯 Y 病毒科、长线形病毒科、马铃薯 X 病毒属、麝香石竹潜隐病毒属、发形病毒属等 9 个线状病毒科或属也都是螺旋对称结构。

（二）二十面体对称

二十面体对称也称等轴对称或立方体对称，这类病毒的衣壳是由衣壳粒按一定方式排列而成的立方对称体（图 2－4）。衣壳

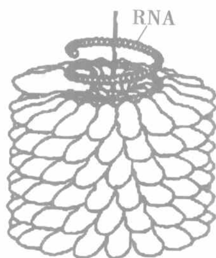


图 2－3 烟草花叶病毒（TMV）螺旋对称结构

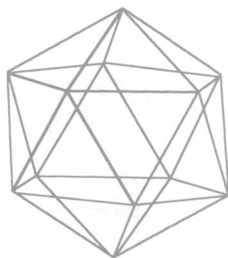


图 2－4 正二十面体模式图

粒沿三根相互垂直的轴形成对称体，衣壳一般二十面体。二十面体具有 20 个面、30 条边和 12 个顶角。每个顶角由 5 个三角形聚集而成，这些点和边都是对称的，这种结构有利于核酸分子以高度卷曲的形式包裹在小体积衣壳内。最简单的二十面体病毒外壳由 60 个相同的蛋白亚基组成，每个三角形面上排列有 3 个亚基，如烟草坏死卫星病毒和线虫传多面体病毒属病毒。二十面体对称

结构的病毒在电镜下其粒子形态为球状，腺病毒的衣壳是这类结构的典型代表，它由 252 个球形的壳粒排列成一个二十面的对称体。

（三）复合对称结构

复合对称结构的病毒其衣壳是由两种结构组成的，既有螺旋对称部分，又有立方体对称部分，故称复合对称，如大肠杆菌 T4 噬菌体。T4 噬菌体如蝌蚪状，其头部外壳由 8 种蛋白质组成呈椭圆形 20 面体，含 212 个壳粒，核酸埋藏在蛋白质外壳中。T4 噬菌体的尾部为螺旋对称结构，由 144 个壳粒组成排成棒状，共分 24 个螺旋。尾部中央为尾髓，中空，是注射核酸的通道。除此之外，T4 还有颈圈、基片、刺突和尾丝等附属结构。植物病毒中呼肠孤病毒科、弹状病毒科、花椰菜花叶病毒科中的杆状 DNA 病毒属和水稻东格鲁杆状病毒属、双生病毒科和番茄斑萎病毒属也都是复合对称结构。

三、植物病毒的化学组成

多数病毒只含蛋白质和核酸两种化学成分，少数大型病毒还含有脂类和糖类。而类病毒只有核酸，缺少蛋白质。

（一）蛋白质

蛋白质是病毒的主要组分，其在病毒中的含量随病毒种类而异，不同种病毒蛋白的氨基酸含量各不相同，病毒的核酸决定了衣壳蛋白的氨基酸组成。植物病毒的蛋白可分为结构蛋白及非结构蛋白两类。结构蛋白是构成一个完整的病毒粒子所需要的蛋白，主要是衣壳蛋白和囊膜蛋白。多数植物病毒无囊膜，其结构蛋白就是衣壳蛋白。绝大多数植物病毒的衣壳蛋白仅由一种多肽构成，个别的有 2 种以上，蛋白多肽链经过三维折叠形成衣壳的基本结构单位衣壳粒。非结构蛋白是指病毒核酸编码的非结构必需的蛋白，包括病毒复制需要的酶，传播、运动需要的功能蛋白等。如花椰菜花叶病毒科的病毒蛋白质中含有 DNA 聚合酶，呼

肠孤病毒科的病毒含有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶。另外，弹状病毒科、纤细病毒属、番茄斑萎病毒属和双分病毒科的病毒也含有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶，这些酶都属于植物病毒的非结构蛋白。

（二）核酸

核酸是病毒的遗传物质，决定病毒的致病性、增殖、遗传和变异。不同形态的病毒粒子中核酸的比例不同。一般说，球状病毒的核酸含量高，占病毒粒子重量的 15% ~45%；杆状病毒中核酸含量占病毒粒子重量的 5% ~6%；而在弹状病毒中只占 1% 左右。病毒只含一类核酸（DNA 或 RNA），因此可将病毒分为 DNA 病毒和 RNA 病毒。植物病毒的核酸大多数为 RNA，少数为 DNA。动物病毒，部分是 DNA，部分是 RNA。噬菌体的核酸大多数为 DNA，少数为 RNA。病毒核酸的类型极为多样化，病毒 DNA 和 RNA 不仅有单链（ss）和双链（ds）、线状和环状，而且还有正链和负链。RNA 病毒多数是单链，极少数为双链；DNA 病毒多数为双链，少数为单链。DNA 病毒核酸既有线状又有环状，但 RNA 病毒核酸都呈线状，罕见环状。凡碱基排列顺序与 mRNA 相同的单链 DNA 或 RNA，具有侵染性，病毒核酸携带病毒的全部遗传信息，直接为 mRNA 合成蛋白质，称（+）DNA 链或（+）RNA 链。凡碱基排列顺序与 mRNA 链互补的单链 DNA 或 RNA，不具有侵染性，必须靠转录酶转录正链后才能合成蛋白质，称（-）DNA 链或（-）RNA 链。按病毒核酸的单双链和复制过程中功能的不同，大体可分为 5 种类型：

1. 正单链 RNA（+ssRNA）

具备 mRNA 的功能，其单链可直接翻译成蛋白质。70% 以上的植物病毒具有这种类型的核酸，如烟草花叶病毒属、黄瓜花叶病毒属、马铃薯 X 病毒属和马铃薯 Y 病毒属等的病毒。侵染植物的一些正单链 RNA 病毒中存在着基因组的分体现象，即同一种病毒的基因组分布在不同的核酸链上，并分别包被在不同大小的病毒颗粒里，如烟草脆裂病毒的核酸就分藏在两种长短不一的颗粒中。在分体病毒中，单独一种颗粒不能侵染植物，烟草脆裂病

毒只有在长颗粒和短颗粒一起感染细胞时才能正常复制。

2. 负单链 RNA（-ssRNA）

不具备 mRNA 的功能，必须转录成互补链，才能翻译成蛋白质。包括弹状病毒科和布尼亚病毒科的病毒。

3. 双链 RNA（dsRNA）

其负链 RNA 转录出正链 RNA，才能作为 mRNA 翻译成蛋白质，如呼肠孤病毒科和双分病毒科的病毒。

4. 单链 DNA（ssDNA）

DNA 链无正负之分，先合成双链 DNA，转录出 mRNA，再翻译成蛋白质，如双生病毒科的病毒。

5. 双链 DNA（dsDNA）

这类 DNA 为互补双链 DNA，DNA 既可作为复制的模板，又可转录翻译为蛋白质。如花椰菜花叶病毒属科的病毒，其中花椰菜花叶病毒（CaMV）的病毒粒子球形，核酸为双链环状 DNA。

（三）脂类和糖类

一些有包膜的大型病毒还含有脂类和糖类等其他成分。病毒所含的脂类主要是磷脂、胆固醇和中性脂肪，它们大多数存在于包膜中，包膜是在病毒成熟时从细胞质膜或核膜获得的，所以病毒脂质常具有宿主细胞脂质的特征。用有机溶剂或去污剂破坏包膜脂质，可使病毒粒子裂解。除核酸中的戊糖外，病毒所含的糖类主要是葡萄糖、龙胆二糖、岩藻糖、半乳糖等，以糖蛋白的形式存在，糖蛋白位于有包膜病毒的表面。此外，植物病毒中还含有大量水分及一些次要成分，如许多病毒还存在着金属离子如钙离子、钠离子和镁离子。

第三节　植物病毒的复制和增殖

病毒的增殖不同于其他生物的繁殖，其过程涉及核酸的复制、蛋白质的表达和子代粒子的装配。病毒的增殖一般可以分为吸附、侵入、核酸复制和蛋白质合成、装配以及释放 5 个阶段。

1. 吸附

病毒粒子通过扩散或分子运动附着在寄主细胞表面特定部分，这个特定部位称受体。受体由蛋白质、多糖或脂蛋白形成多糖复合物组成，这个吸附过程有高度的专一性和特异性。噬菌体以其尾部吸附细菌细胞壁上。据研究，一个细菌细胞表面约有300个吸附位点。不同噬菌体有不同受体，若受体部位的结构发生改变，或病毒发生变异，吸附都不能发生，则该细菌对噬菌体产生抗性。有胞膜病毒以胞膜刺突吸附在受体上；动物病毒以吞噬、胞饮作用进入；植物病毒除弹状病毒中的莴苣坏死黄化病毒等有刺突外，其余均无专门的吸附结构，而且植物细胞表面也无受体结构。

2. 侵入

不同病毒粒子侵入寄主细胞的方式不同。噬菌体通过注射机制将核酸注入宿主细胞内，尾部吸附在细胞壁上。溶菌酶水解细胞壁，尾鞘收缩将头部 DNA 压入，蛋白质外壳留在细胞外，也有的噬菌体吸附在纤毛上，通过纤毛收缩将核酸引入细胞。动物病毒以类似吞噬作用的胞饮方式，整个粒子吞入再脱壳。植物病毒的侵入方式都是被动的，主要有通过媒介昆虫刺吸式口器损伤植物细胞而侵入；通过人工嫁接或摩擦接种的伤口侵入；还可以通过其他方式如真菌侵入和花粉管感染细胞，并借助胞间连丝、导管和筛管在植株中扩散。与噬菌体不同的是植物病毒绝大多数是侵入宿主细胞内才脱去蛋白质外壳。

3. 核酸复制和蛋白质合成

病毒核酸复制共有6种方式：双链 DNA（dsDNA）的病毒其转录方式与宿主细胞相同；含单链 DNA（ssDNA）的病毒需要通过双链阶段后再转录出 mRNA；含单链正链 RNA（+ssRNA）的病毒如烟草花叶病毒，其 RNA 可直接作为信使 mRNA，合成蛋白质；含单链负链 RNA（-ssRNA）的病毒，需先转录成互补的正链作为 mRNA；ssRNA 的反转录病毒，需先经反转录成 dsDNA 而整合到宿主染色体中，再转录成 mRNA；含 dsRNA 的呼肠孤病毒，

则以保守型复制方式转录出与原来双链中的正链相同的 mRNA。大部分植物病毒的核酸转录在细胞质内进行，部分在细胞核进行。需要寄主提供转录酶、核苷酸、ATP 等物质。病毒自身提供的主要是模板核酸和复制酶。病毒利用寄主提供的核糖体、氨基酸等物质和能量，翻译成蛋白质，如外壳蛋白、运动蛋白等。不同病毒的 mRNA 翻译方式也各不同。噬菌体的翻译是一般多顺反子的，可沿着 1 条 mRNA 独立地翻译出几种多肽。动物病毒的翻译是单顺反子的，即每种 mRNA 翻译成一种多肽。分节段基因组病毒如呼肠孤病毒，每 1 节段 RNA 构成 1 个顺反子，多分体基因组的植物病毒也是如此。芜菁花叶病毒的 mRNA 先被翻译成 1 个大分子量的多肽，再裂解成为衣壳蛋白和酶等。

4. 装配

装配指的是病毒核酸和蛋白质在被感染的细胞内合成子代病毒粒子的过程。T4 噬菌体的装配过程是首先衣壳包裹 DNA 形成头部，尾部独立装配，接着头、尾结合，再装上尾丝，形成完整的病毒粒子。二十面体病毒大多是先聚集其衣壳，然后再装入核酸。最简单的装配方式，如烟草花叶病毒是核酸与衣壳相互识别，由衣壳粒按一定方式围绕 RNA 聚集而成，不需要酶和能量。

5. 释放

释放是指病毒粒子从感染细胞内转移到外界的过程。通常没有包膜的病毒以裂解寄主细胞方式释放，使寄主出现空斑、枯斑病症。有包膜的病毒，在细胞内装配完后转移至被病毒修饰了的细胞核膜或质膜下面，以出芽方式释放病毒粒子。

内含体是植物细胞内由增殖的病毒、病毒的核酸和寄主的一些成分如蛋白质聚集而成的结构。内含体可借助简单染色和光学显微镜进行观察，内含体有不同的形状和大小（图 2－5）。存在于细胞核内的内含体，称为核型内含体；存在于细胞质中的称为质型内含体。不同属的病毒往往产生不同类型、不同形状的内含体，所以可根据内含体的特征鉴定不同的植物病毒，同时也可用于植物病毒病的诊断。



1. 水滴状内含体；2. 结晶状内含体；3. 血球状内含体

图2-5 植物感受病毒后在细胞内形成的内含体（如箭头所示）

第三章 雪菜病毒病的诊断和病毒鉴定

第一节 植物病毒病诊断的原则和方法

一、植物病毒病诊断的原则

由于遗传生理病害、非侵染性病害、药害以及支原体引起的病害都与病毒病症状相似，因此植物病毒病的诊断及病原鉴定常比真菌和细菌病害复杂得多。植物病毒病的诊断应遵循柯赫氏法则（Koch postulates）的4条原则：

（1）必须在大量的感病植物中检测到病原。

（2）病原必须从单一侵染的寄主中能被分离，并对其特性进行描述。

（3）将病原接种同种植物，产生的症状应与田间观察到的症状相符。

（4）病原必须从被侵染的植物中再次被分离，其特性与首次描述的相符。

植物病毒病的诊断包括2个方面：首先对植物病样作初步检查与判断，确定植物发生的病害是否是病毒病；其次对明确是病毒病的样本作进一步的实验诊断，必要时还要进行病原鉴定。根据病毒的普通生物学特征、血清学反应、分子生物特性等，根据国际权威病毒分类体系，最终确定该病毒的分类地位和名称。

二、植物病毒病诊断的方法

植物病毒病的诊断通常要依据鉴别寄主植物、病毒传播方式、病毒包含体、电镜、血清学反应和分子生物学鉴定等进行。

（一）病害初步诊断

首先要区分非侵染性病害与侵染性病害。诊断要点是：发生病毒病的植株多为系统感染，新叶上症状最明显，而生理性病害新叶老叶上症状相似；病毒病有发病中心或中心病株，早期病株点片分布，而非侵染性病害大多同时大面积发生；病毒病害症状往往表现为花叶、黄化、矮缩、丛生等，少数有脉带、环斑、耳突、斑驳、蚀纹等特征性症状。病毒病有传染性，非传染性病害无传染扩散的过程；病毒病与其他侵染性病害的主要区别是：系统侵染病毒病的症状在新展幼叶上更重，而其他病害则大多在老叶上症状更明显。

（二）利用鉴别寄主诊断

用来鉴别病毒或其株系的具有特定反应的植物称为鉴别寄主。组合使用的几种或一套鉴别寄主称为鉴别寄主谱。鉴别寄主谱中一般包括可系统侵染的寄主、局部侵染的寄主和不受侵染的寄主。鉴别寄主植物用于植物病毒病的诊断，主要依据寄主病症、寄主范围和交叉保护现象等三方面。在自然界，植物病毒的寄主范围变化很大。有些病毒寄主范围比较广，例如，黄瓜花叶病毒（CMV）有 67 科 476 种寄主；有些病毒只有一种寄主植物，如属石竹潜隐病毒组的马铃薯 M 病毒（PVM）。对于寄主范围比较窄的病毒来说，寄主范围有助于诊断，如属于联体病毒科和南方菜豆花叶病毒属的病毒。病毒弱毒株能保护植物免受强毒株的侵染，这种交叉保护现象曾被认为可用于相关病毒株系间的鉴定。很多例子表明，在相关病毒株系间存在不完全，难于检测的交叉保护作用，而在不同的病毒组的病毒间却存在交叉保护。大田作物常被多种病毒、病毒株系及卫星 RNA 复合侵染，在这种情况下，不同寄主植物可用于病毒的分离。当一种病毒由 2 种病毒专性联合侵染时，用鉴别寄主植物诊断尤为重要。寄主病症、寄主范围和交叉保护现象都可作为病毒病诊断的参考。但病毒的最后鉴定，还需应用其他方法。

（三）利用病毒的传播方式诊断

在植物间相互传播，这是植物病毒的最基本特征。通过病毒的传播试验可判断植物的病症是由病毒还是别的因素（如营养缺陷或基因缺失等）引起。病毒的非介体传播可通过嫁接、菟丝子、机械摩擦、种子和花粉等进行。

在早期的植物病毒研究中，嫁接接种是病毒传播试验的重要手段。病毒在嫁接接种中传播的速度，常作为病毒鉴定的根据。而且，嫁接接种也往往用于分离复合侵染中的不同病毒。对木本植物来说，嫁接接种敏感的指示作物是鉴定一些病毒和病毒株系的唯一方法。虽然嫁接接种有这些特殊用途，但它仍有不少缺点：①需要相当的技巧；②木本植物上病症出现的时间长，一般需要几个月，甚至2~3年；③对于单子叶植物不太适用；④不能传播潜隐病毒，而且病毒不是通过嫁接传播的唯一病害。因此嫁接接种只是一种粗放的病毒检测手段。

菟丝子传播也是早期植物病毒研究的常用方法，现在很少使用。它唯一的优点是能传播一些不能由嫁接接种传播的病毒，但它也不能传播潜隐病毒，菟丝子传播也具有与嫁接接种相同的一些缺点。

植物病毒机械接种的方式包括：摩擦、注射、针穿刺、喷枪以及电内渗器等。大约有80%植物病毒能机械接种传播，而一些由叶蝉等昆虫介体持久性传播的病毒，不易或者不能由机械接种传播。豌豆耳突花叶病毒（PEMV）和莴苣坏死花叶病毒（LNYV）是例外，它们既由蚜虫持久传播，又能机械接种传播。与嫁接或菟丝子传播方式相比，机械传播更利于病毒寄主范围、病症和许多其他性状的研究。植物机械接种后，若获得寄主上好的局部病斑，则可对病毒进行纯化，进行蔗糖梯度密度离心，与有机溶剂、螯合物、盐等反应。综合这些结果，可掌握该病毒的基本特征，有利于正确鉴定。植物病毒机械传播的能力，不能作为病毒鉴定的唯一标准，但它是病毒诊断的一个较重要步骤，为别的诊断试验提供了一个灵敏的分析工具。

种传病毒在植物病毒的生态学和流行学上起主要作用。在自然界，容易种传的植物病毒属包括：大麦病毒属属、线虫传多面体病毒属、马铃薯 Y 病毒属、烟草花叶病毒属、烟草脆裂病毒属以及类病毒。Bennett 总结种传病毒的 2 个普遍特征：①不容易由汁液传播的病毒一般不能种传；②病毒种传与病毒颗粒形态和核酸类型无明显关系。在一些特别寄主中，种传病毒的检测可以排除属于同属的相似病毒。

花粉水平传播病毒在 1918 年还只是假设，Das 和 Milbrath 第一个证实了它的存在。目前已知只有一些病毒是由花粉水平传播。实际上，这种传播方式发生频率很低。所有已报道的由花粉水平传播的病毒，也可种传或机械接种传播，这些特性有助于病毒诊断。

不同植物病毒属具有不同的传播介体，确定病毒的传播介体不但可以为防治提供依据，同时进一步缩小了工作范围。虫传病毒的介体确定工作量大，不但需要获得无毒虫并进行饲养，还要通过一系列试验来确定昆虫与病毒的生物学关系。由于血清学和分子生物技术的出现，用传播试验来诊断病毒病现在已不太多用。但通过各种传播方式，把病毒接种至寄主植物上，还是研究新病毒和病毒株系的常用方法。目前，这种方法仍被广泛应用于以下方面：①判断植物病害是否由病毒引起；②区分复合侵染中的不同病毒；③研究新病毒、病毒株系和病毒变异体；④判断卫星 RNA 是否存在。

（四）利用病毒内含体诊断

植物病毒的内含体大多存在于有典型症状的部位，内含体的细胞学研究为病毒病诊断提供了依据，它是一种快速且相对廉价的方法。通过研究内含体，可判断病害是否由病毒引起。内含体观察一般都选用新鲜病叶进行切片检查，不同属的植物病毒往往产生不同类型和形状的内含体，利用这种不同还可在属、种和株系水平上进行病毒的鉴定。早在 1939 年，Kassanis 就提出核型内含体是诊断烟草蚀纹病毒（TEV）有价值的特征。通过对十字花

科芸薹属植物上质型内含体的研究，可鉴定出侵染芸薹属植物的重要病毒有花椰菜花叶病毒属、芜菁皱叶病毒（TCV）、芜菁花叶病毒（TuMV）、芜菁黄花叶病毒属和萝卜花叶病毒（RaMV）。Kitajima 指出核型内含体可作为弹状病毒的诊断参考。Brunt 曾总结了 18 个病毒属有诊断价值的内含体。

植物病毒内含体的细胞学研究主要包括内含体类型、形态、组成、亚结构以及在寄主植物细胞中的位置等。光学显微镜常用于内含体研究，在显微镜下采用合适的染色反应，使内含体的类型容易辨认，并能与寄主的组织细胞相区别。例如，大田作物的病毒复合侵染，常用光学显微镜来观察内含体，在病毒属间或属内进行鉴别。但是有些病毒的鉴定则还要依赖电镜，以提供更多的内含体组成和亚结构等方面的资料，如芜菁花叶病毒和番茄丛矮病毒科的病毒等。使用光学显微镜或电镜研究内含体，可在病毒属的水平上鉴别病毒。如果与血清学技术相结合，如采用免疫显微、胶体金颗粒标志等技术，则可以在种或株系的水平上鉴定病毒。

（五）利用血清学反应诊断

近十多年来，血清学试验与现代生物技术相结合，不断涌现出新方法，其中酶联免疫吸附测定（ELISA）是在植物病毒诊断上最广泛使用的一种血清学技术。ELISA 反应有多种方法，但基本过程都是将抗原（或抗体）吸附于固相载体，在载体上进行免疫酶染色，底物显色后，用肉眼或分光光度计判定结果。虽然 ELISA 反应的灵敏度比核酸杂交技术稍差，但由于它快速而且便利，因此对于大规模田间样本的常规病毒检测很合适。ELISA 反应被广泛用于脱毒植物、无性繁殖的苗木，以及种子上的病毒检测。第二种在植物病毒病诊断上常用的血清学技术是免疫扩散，尤其是双扩散技术。凝胶上抗原抗体相互扩散，最终形成的沉淀线，可以用来比较同源、异源抗原，甚至可以区别病毒的不同种和不同株系。第三种常用的血清学技术是斑点吸印免疫分析法，它可直接用粗汁液对病毒进行大规模检测。当被测样本数量较小时，免疫吸附电镜（ISEM）也很适用，它结合了血清学反应的特

异性与电镜的高灵敏性，灵敏度与 ELISA 相似。但由于仪器设备的昂贵，限制了 ISEM 在植物病毒诊断上的广泛使用。其他的一些血清学技术，如凝集试验、沉淀反应、免疫电泳、放射免疫和荧光免疫等技术也可用于植物病毒病的诊断与病毒鉴定。

（六）利用电镜诊断

利用电子显微镜诊断植物病毒病最常用的是负染色法、超薄切片法和免疫电镜技术。负染指通过重金属盐在样品四周的堆积而加强样品外围的电子密度，使样品显示负片的影像，衬托出样品的形态和大小。常用负染色剂为磷钨酸、钼酸铵、醋酸铀和甲酸铀等，一般采用 2% 磷钨酸溶液。对于不稳定的病毒，可先用 1% ~2% 戊二醛或甲醛进行固定，然后再进行负染。负染色法对纯化样品和病组织粗汁液样品都适用。电镜观察时，杆状和线状病毒以及一些形态特殊的病毒粒子容易辨认，但直径 20 ~ 30 nm 的等轴状病毒粒子则很难与周围的细胞相区别，因此要结合生物学和血清学方法来综合分析。电镜负染技术鉴定植物病毒的优点是快速、简单和直观，从加样到结果只需 5min。

超薄切片法主要用于观察病毒粒子在寄主细胞内的分布以及细胞内含体等结构。超薄切片常用戊二醛和四氧化锇进行双固定，或者用戊二醛和醋酸铀进行混合固定，Epon812 树脂包埋样品。超薄切片的厚度一般为 50 ~ 70 nm。有些病毒粒子在寄主细胞内局部分布，因而取样和切片中准确定位非常重要，如处于韧皮部的病毒应在韧皮部的筛管、伴胞及周围细胞中寻找。不同病毒选择合适的寄主植物和感染时间也很重要，应选系统性寄主，不宜用坏死枯斑寄主。取材时要取叶片的黄绿交界处，这些部位病毒含量高且细胞尚未被完全破坏。同时还应设健康对照，便于区别正常的细胞结构与病理结构。

电镜技术灵敏度与 ELISA 反应相似，但不如核酸杂交技术。电镜技术若与别的技术结合，则更有利于植物病毒的鉴定。免疫电镜技术就是电镜技术与血清学反应相结合所产生，是将抗原抗体反应的特异性与电镜的高分辨能力和放大本领结合在一起，因

而可准确分辨出形态相似的不同病毒。常用的免疫电镜技术有免疫吸附法、蛋白A吸附法、修饰法、凝集法等。免疫吸附法是用特异性抗体预先包被的载网来捕获样品溶液中的病毒，再负染，从而大大增加电镜视野中病毒粒子数量，提高诊断的灵敏度。蛋白A吸附法是先用葡萄球菌蛋白A包被载网，再结合抗体来捕获病毒，可以进一步增加灵敏度。修饰法是将吸附于载网的病毒粒子与抗体进行反应，在电镜下观察特异性免疫反应所产生的病毒粒子表面抗体“晕圈”，来判断血清学关系。该方法尤其适用于病毒种或株系的诊断、复合侵染病毒的检测等。应用免疫电镜技术可以满足许多病毒的诊断与鉴定工作，但电镜操作需要一定技能，而且工作比较集中，所以样本数量大则不易处理。

（七）利用核酸杂交及PCR技术诊断

过去大多数病毒的诊断方法是针对病毒外壳蛋白设计的。如今针对病毒核酸的诊断方法也在逐步发展。其中核酸杂交和聚合酶链式反应（PCR）最常用。在一定的条件下，RNA－DNA形成异质双链的过程称为核酸杂交。预先分离纯化或合成的已知核酸序列片段叫做杂交探针，大多数植物病毒的核酸是RNA，其探针为互补DNA，也称为cDNA探针。核酸检测不仅可以检测到目标病毒的核酸，而且还可以检测出相近病毒（或核酸）间的同源程度。利用PCR技术来自任何病毒的少量特定核酸片段都可以被扩增，这些片段可通过琼脂电泳分析大小，并可由限制性内切酶切割。PCR技术可用于植物病毒诊断，如马铃薯Y病毒（PVY）、豌豆种传花叶病毒（PSbMV）、大麦黄矮病毒（BYDV）等。核酸杂交技术用于植物病毒病的诊断，最重要的特征是高度灵敏性。PCR技术理论上被认为可以检测靶病毒上的单个分子，通过采用PCR技术和精确的核酸探针，可以检测病毒或者株系，如马铃薯X病毒（PVX）和马铃薯Y病毒（PVY）的株系等。

（八）利用病毒的dsRNA诊断

植物病毒病诊断时，采用dsRNA分析方法只是对血清学反应

等特异性实验的补充。很多植物病毒有 RNA 基因组，单链或双链。病毒 RNA 基因组常被分段，这些片段的数量和大小常作为病毒诊断依据。dsRNA 分析法在植物病毒诊断上有 3 个方面用途：（1）判断 RNA 病毒是否存在；（2）在病毒属水平上，对病毒进行检测，如真菌传直杆状病毒属等；（3）鉴别单个病毒或株系，观察病毒染色体组对应的主要 dsRNA 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上的迁移率，可鉴别不同病毒株系，如黄瓜花叶病毒（CMV）的两株系；（4）检测卫星 RNA 和卫星病毒。

dsRNA 分析法是非特异性的实验方法，可检测样本的任何 dsRNA，包括数量少的病毒，以及除病毒侵染外其他来源的 dsRNA。因而，它很适合于病毒复合侵染的诊断。dsRNA 分析法还可对来自田间的样本直接检测，如果是新病毒或不易纯化的病毒，dsRNA 分析则是病毒检测的唯一选择。但 dsRNA 分析法也有局限性：①最明显是无法用于大数量样本的试验；②诊断需要知识和技能，尤其当无法与已知病毒相比较时；③病毒诊断时进行的 dsRNA 分析，常包括潜隐病毒和非病毒的 dsRNA；④dsRNA不能用于 DNA 病毒检测，也未见报道可用 dsRNA 分析法，诊断负链 RNA 病毒，如弹状病毒科病毒。正如植物病毒别的诊断方法，dsRNA 分析法也应与其他技术相结合，取长补短，才能更好地进行病毒病诊断。

（九）利用病毒理化特性诊断

病毒的理化特性包括病毒粒子的沉降系数及分子量、稀释限点、钝化温度、体外存活期、光谱吸收特性、pH 稳定性、离子稳定性、表面活性剂稳定性等。核酸的紫外线吸收高峰在 260 nm 左右，蛋白质在 280 nm 左右。260/280 的比值可以表示病毒核酸的含量，用于区分不同的病毒。线条病毒比值大多较小，比值高可能是球状病毒。对同一种纯化的病毒，紫外吸收值可以表示病毒的浓度。

稀释限点指的是保持病毒侵染力的最高稀释度，反映病毒的稳定性和侵染能力。

处理10min使病毒丧失活性的最低温度为钝化温度，用摄氏度表示。大多数植物病毒钝化温度在55～70℃。体外存活期指在室温下病毒抽提液保持侵染力的最长时间，大多数病毒的存活期在数天到数月。

总的来说，植物病毒病的诊断比几十年前容易了，这主要归功于灵敏的检测技术的出现，如电镜扫描、血清学反应和核酸杂交技术等。随着分子生物学技术的发展，植物病毒病的准确诊断必将日益快速、便捷。

第二节　芜菁花叶病毒病的诊断与病毒鉴定

芜菁花叶病毒（TuMV）分布相当广泛，是一个全球性病害，主要分布在温带和热带地区，五大洲均有报道（Provvidenti，1996）。据28个国家和地区的病毒病调查，TuMV仅次于黄瓜花叶病毒（CMV）成为侵染大田蔬菜的第二大病毒，在亚洲、北美洲和欧洲部分地区对芸薹属作物和蔬菜危害最为严重（Tomlinson，1987）。TuMV也是我国十字花科蔬菜重要的病毒病病原，在我国绝大部分地区均有发生，引起大白菜孤丁病、油菜花叶病、榨菜缩叶病、萝卜花叶病、豌豆花叶病、芝麻矮化病和温州盘菜病毒病等，给蔬菜生产造成了巨大的经济损失。由TuMV为主要病原的病毒病在大白菜上常年发病率为10%～30%，严重的达80%～90%（杨峰等，1992）。TuMV引起的油菜病毒病是影响我国油菜生产的第二大病害，仅次于菌核病。在我国长江中下游，油菜因病毒病减产一般达20%～30%，大流行年份达50%（卢爱兰等，1996）。蔡岳松等（1991）在1987～1989年三年间采集了来自四川榨菜主要产区600份榨菜病样，结果TuMV检出率为79%，并与CMV和烟草花叶病毒（TMV）复合侵染，造成榨菜年损失四成多（蔡岳松等，1991）。

通过宁波市鄞州区绿原雪菜开发研究中心与浙江大学生物技术研究所合作进行的《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研

究》课题的实践，课题组已鉴定出宁波雪菜病毒病主要病原是TuMV。对芜菁花叶病毒病的诊断与病毒鉴定，过去往往以寄主病症和寄主范围为主要依据，现证实这不太可靠，它只能作为一种辅助手段。因为：①不同病毒在同种植物上常产生相同症状；②同种病毒的不同株系可产生不同症状；③混合病毒、株系及卫星 RNA 会影响症状表现；④同种病毒对植物的不同栽培品种影响不同；⑤不同土壤和气候条件可改变症状表现。尽管许多植物病毒的研究是在温室中采用鉴别寄主进行，但这些寄主病症的表现也会受到一些因素制约，例如：温度、光照和植物苗龄等。此外，病毒的潜隐侵染也是个问题，它没有病症表现，无法进行症状研究，而且病毒在寄主上的潜隐侵染，并不总是能够由回接鉴别寄主来确定。有时病毒的复合侵染可使病症变轻或加重，这也给症状鉴定带来困难。在 20 世纪 90 年代中期之前，传统的寄主反应和寄主范围不仅用于 TuMV 检测和鉴定，而且还一直用于 TuMV 病毒株系的划分，现在证实这种划分标准存在很大的局限性。目前，芜菁花叶病毒病的诊断与病毒鉴定的方法主要有以下几种：

1. 利用病毒传播方式

病毒在自然界中的传播方式是分类鉴定的重要依据。特别是对于那些不能汁液传播的病毒尤为重要。有许多病毒通过专一性介体传播，有关介体种类及其分类地位、传毒是持久性的还是非持久性的、介体获毒时间、释毒时间、病毒在介体中能否增殖等在病毒鉴定上有重要意义。在自然界，TuMV 通常都通过蚜虫和汁液接触传播，在温室中又可人工摩擦接种，TuMV 可分为蚜传和非蚜传株系。

2. 利用电镜和病毒内含体诊断

现代高分辨力电镜的分辨率已达到 8Å（$1Å = 10^{-10}$），利用高分辨电镜技术、光学衍射、计算机图像处理和三维重构等手段，可以准确地观察病毒粒子的微细结构，可以在电镜下明确显示出病毒的衣壳粒排列、螺旋形态、病毒粒子两端结构以及三维立体结构，因此电镜是直观地观察病毒粒子形态结构以及病毒侵

染寄主后引起的细胞超微结构变化的最有用工具。TuMV 粒子弯曲线形，并且具有马铃薯 Y 病毒属所特有风轮状内含体的细胞学特征，这为 TuMV 的检测和鉴定提供了依据。

3. 利用血清学反应

在 TuMV 检测与鉴定上最广泛使用的血清学方法是酶联免疫吸附测定法（ELISA）。1977 年 Clark 和 Adams 首次将 ELISA 法用于检测植物病毒，其原理是把抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化作用结合在一起。通过化学方法将酶与抗体结合起来，形成酶标抗体。在遇到相应的底物时，催化无色底物产生水解、氧化或还原反应，生成可溶性或不可溶性的有色化合物。ELISA 具有灵敏度高、特异性强、操作简便等特点。常用的 ELISA 方法有：直接法、间接法和夹心法，夹心法包括双抗体夹心法（DAS－ELISA）、三抗体夹心法（TAS－ELISA）等。

早在 20 世纪 60 年代初，胡吉成（1962）等制备了 TuMV 抗血清，并将该抗血清用于检测田间白菜感病情况。朱培坤（1984）用血清学检测 TuMV 分布，发现它在上海市郊区能侵染 13 科 38 种以上植物，越冬寄主有 5 科 13 种。李丽丽（1987）等用抗血清检测了长江地区油菜上病毒病的毒原种类。李彦勇（1984）用间接 ELISA 对芜菁花叶病毒血清学之间的关系进行了研究，并认为间接 ELISA 比直接 ELISA 更适用于 TuMV 病毒诊断及株系鉴定。此外，蔡岳松（1991）、杨峰（1992）、赵荣乐（2002）、施曼玲（2003，2006）和周利飞（2007）等分别在 TuMV 侵染引起的榨菜病毒病、芝麻黄花型病害、萝卜病毒病、雪菜花叶病以及烟草病毒病的病原检测和鉴定中，都采用 ELISA 方法。

4. 利用单克隆抗体

植物病毒单克隆抗体的研制始于 20 世纪 80 年代早期，1982 年德国科学家 Dietzgen 最早研制出烟草花叶病毒的单克隆抗体。目前已制备了 60 多种不同病毒的单克隆抗体并广泛用于植物病毒学的研究中。我国自 1985 年至今也陆续制备了 20 多种植物病毒的单克隆抗体，并已很好地用于病毒检测。

多克隆抗体是由纯化的病毒粒子免疫动物所得，它不仅容易与亲缘关系相近的病毒发生交叉反应而使病原不能准确鉴定，而且易与植物体内蛋白发生交叉反应而使最终的检测结果难以判断。而且多克隆抗体的检测灵敏度有限，对于在寄主体内含量较低的病毒不能很好地检测。而单克隆抗体是针对同一抗原决定簇，在分子上是同质的抗体，因而与传统的多克隆抗体相比，它具有特异性更好、检测灵敏度更高等多克隆抗体无可比拟的优势。单克隆抗体为病原的准确鉴定和大量检测提供了可能，它广泛地运用在 TuMV 的检测和鉴定上，Horsewood 等在 1991 年就制备了 TuMV 单克隆抗体并用于病原的检测。施曼玲等（2004）以 TuMV 免疫 BALB/C 小鼠，取其脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞融合，经筛选、克隆，获得 4 株能稳定传代并分泌抗 TuMV 单克隆抗体的杂交瘤细胞，并制备腹水单克隆抗体。4 株单克隆抗体腹水 ELISA 效价在 10^{-6} ~ 10^{-5}，仅对 TuMV 起特异性反应。Western blot 分析表明，4 株单克隆抗体都能与 TuMV 34KD 的外壳蛋白亚基起特异反应。利用 TuMV 的多克隆抗体兔血清和单克隆抗体腹水建立了 TAS-ELISA 检测 TuMV 的方法，检测病叶的灵敏度为 1：5 120倍，检测提纯 TuMV 病毒绝对量为 21.9ng。TAS-ELISA 法检测 TuMV 既可以定性分析，又可以定量分析。《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》课题组利用所建立的 TAS-ELISA 法鉴定出宁波雪里蕻花叶病的病原是 TuMV，并对 53 个雪里蕻栽培品种在温室和大田进行了人工接种 TuMV，通过 TAS-ELISA 检测共鉴定出抗病品种 7 个，耐病品种 22 个，感病品种 24 个。

利用单克隆抗体可以识别存在于抗原表面的、不同于其他病毒或株系的单一抗原表位的特性，可用于确定同一属病毒及同一病毒的不同株系之间的抗原关系，因而可对不同分离物进行归类和株系划分。血清学研究表明多克隆抗体可以区分 TuMV 和其他马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus* 病毒，但只有单克隆抗体才能用于 TuMV 株系的区分，有几个实验室制备了可以区别 TuMV 不同株系的外壳蛋白 CP（coat protein）单克隆抗体。Kantrong（1993）等研制了针对蚜传和非蚜传的 TuMV 株系的单克隆抗体，Jenner

（1999）用一组30种单克隆抗体将来源于不同寄主和地理区域的41个TuMV分离物划分为3个血清型。优势血清型包含30个分离物，包括芸薹属/欧洲/新大陆类分离物。刘栩平等将我国大白菜上的TuMV的7个株系，制备了单克隆抗体，证明这些株系不仅在致病力上具有显著差异，而且在抗体结构及性质、病毒颗粒特性上均具有差异。杨峰等（1992）建立了5类分泌抗TuMV的单克隆体（MAb）的杂交瘤细胞株，其中一类对TuMV的5个株系都有反应，其余4类只对TuMV特定株系有特异性反应。

单克隆抗体是很好的同质试剂，仅识别一个对应的抗原决定簇。因此，可以利用单克隆抗体与相应的抗原决定簇结合的特性，研究病毒抗原表位的定位、抗原表位的数量及其相互关系。刘栩平等（1991）研制出的16株TuMV单克隆抗体进行株系抗原表位分析，识别出6个抗原表位。Kundu等（2000）利用单克隆抗体鉴别出CI蛋白的N′端103-119和224-237两氨基酸残基，是TuMV与ZYMV交叉反应的两个抗原表位。

病毒蛋白分子的表面可能包括多个重叠的抗原表位，其中有许多是依靠蛋白自身组成与特异性抗体发生反应。Benjamini等在1977年用针对CP亚基的特异性多克隆抗体来研究TMV CP的抗原结构，而单克隆抗体在区分病毒CP蛋白的抗原结构方面比多克隆抗体具有明显的优势。叶荣等（1996）制备了TuMV不同分离物的单克隆抗体，结合TuMV－CP酶解图谱，Western-blot和ELISA对TuMV不同分离物的CP抗原结构进行比较。

单克隆抗体还具有作为探针分析病毒基因产物的功能。Kantrong等（1995）利用单克隆抗体发现TuMV的*CP*基因N′端第8位点上的氨基酸残基，在单克隆抗体与CP N′端特异性的结合中起关键作用，后来发现这氨基酸残基是个保守的氨基酸基序（DAG），DAG参与了外壳蛋白和辅助成分（它和蚜虫的口针结合）的结合，因此可判断CP在蚜虫的传毒过程中起重要作用。

另外，通过制备针对病毒非结构蛋白的单克隆抗体，可以利用免疫学技术对其进行生化特性分析，也可作为探针确定蛋白的

功能及其与寄主植物的互作关系。McClintock（1998）等用 TuMV 抗独特型的单克隆抗体诊断出与 TuMV 外壳蛋白互作一个 37kDa 的寄主蛋白。

5. 利用分子生物学技术

近年来，分子生物学技术开始用于 TuMV 病原的检测。邓晓东等（2000）证明了地高锌标记的 DNA 探针用于白菜、芥菜等蔬菜 TuMV 病毒的检测，比用间接 ELISA 检测灵敏度高 6 倍。庄木等（2002）和周利飞等（2007）分别利用 RT-PCR 技术，建立了十字花科蔬菜和烟草 TuMV 检测的快速方法。1990 年 Jansen 等将免疫学方法和分子生物学检测技术有机结合起来，建立了免疫捕捉反转录 PCR（IC-RT-PCR）检测方法，并且成功检测了多种植物病毒。IC-RT-PCR 法与反转录 PCR 法（RT-PCR）相比，省却了提取 RNA 的步骤，合成 cDNA 时各种试管及试剂无需作特殊处理，因而操作方便简单，是一种快速有效的检测方法；与 ELISA 检测相比，可以直接从病汁液中捕获病毒粒子，起到了浓缩和纯化病毒的作用，又利用 PCR 技术放大了检测的灵敏度。施曼玲（2003）用 IC-RT-PCR 方法鉴定出浙江榨菜病毒病的病原是 TuMV；在与宁波市鄞州区雪菜开发研究中心合作进行《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》项目实施期间从浙江宁波雪菜上获得 116 株呈花叶症状的病毒样品，TAS-ELISA 检测表明 97 株雪菜花叶样本均检测到芜菁花叶病毒（TuMV），所有的样本都没有检测到黄瓜花叶病毒（CMV）和烟草花叶病毒（TMV）。利用 IC-RT-PCR-对部分 TuMV 样本中的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因进行了扩增，所有样品都得到约 0.8kb 和 1.4kb 的两条特异条带，确认宁波雪菜花叶病的病原也是 TuMV。

第三节　宁波雪菜花叶病毒病病原的检测与鉴定

《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》课题实践中对宁波雪菜花叶病毒病的诊断与病毒鉴定的方法主要有：

一、对提纯病毒进行电镜观察

2002 年 2 月，施曼玲在浙江宁波自然发病的雪菜病株上得到 TuMV 分离物 - NBXC。NBXC 接种青菜后提纯病毒。病毒提纯的具体方法如下：称取 160g 病叶，加 3 倍体积（480mL）预冷的 0.5mol/L 磷酸钾盐缓冲液（KPB，pH7.5，内含 0.1% 巯基乙醇，0.01% Triton X - 100），匀浆 2 ~ 3min，匀浆液经双层纱布过滤后，6 000 rpm 离心 20min，取上清，加入 Triton X - 100、PEG（MW 6 000）和 NaCl，使终浓度分别为 2.5%（v/v）、6%（w/v）和 0.1mol/L，4℃搅拌过夜。11 000rpm 离心 15min，弃上清，沉淀用 40mL 0.5mol/L KPB（含 0.01mol/L $MgCl_2$，0.5mol/L 脲）充分悬浮。6 000rpm 离心 15min，取上清。33 000rpm 超速离心 90min，取沉淀。沉淀用 2mL 0.5mol/L KPB（含 0.01mol/L $MgCl_2$，0.5mol/L 脲）充分悬浮。8 000rpm 离心 15min，取上清。上清用 20% 甘油垫 33 000rpm 超速离心 90min，弃上清，沉淀用 1mL 0.5mol/L KPB（含 0.01mol/L $MgCl_2$，0.5mol/L 脲）充分悬浮。8 000rpm 离心 15min，留上清，此上清即为提纯病毒。

将提纯病毒适当稀释，滴一小滴于 Parafilm 膜上，取有支持膜的铜网，膜面朝下置于液滴表面，3 ~ 5min 后夹起铜网，用滤纸吸干铜网上的余液，再将铜网倒扣于 3% 磷钨酸（PTA）液滴上，2min 后吸干余液，置 JEOL JEM-1200E-X 电镜下观察病毒粒子形态（图 3 - 1），并测量大小。以 0.01M 磷酸缓冲液（pH 值 7.0）稀释病毒，在紫外分光光度计上测 oD_{260}，根据以下公式计算病毒浓度和产量：

$$浓度(C) = \frac{A260}{\sum_{1cm}^{0.1\%} 260\ nm} \times 稀释倍数$$（其中 $\sum_{1cm}^{0.1\%} 260\ nm$ 为消化系数）

在《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》课题实施中，应用了电子显微镜技术通过负染色在电镜下对雪菜病毒粒子的形态、大小、表面微细结构、有无包膜等进行了观察，发现雪菜病毒粒子弯曲线形，大小约为 740 nm × 12 nm，具有芜菁花

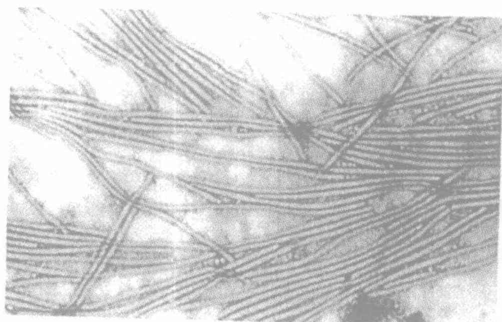


图 3－1　TuMV 分离物 NBXC 提纯病毒粒子的电镜观察（48 000 ×）

叶病毒典型的形态学特征。同样，利用这一技术对烟草花叶病毒等螺旋对称杆状病毒，也可以直接用病样粗汁液负染色观察，并依据病毒粒子的大小和弯曲程度一般能判断到科或属。课题实施中未发现有烟草花叶病毒等螺旋对称杆状病毒。鉴于等轴对称球状病毒，不易用病组织粗汁液直接进行电镜观察，而改用提纯病毒进行观察，结果也未发现其他形态的病毒粒子。同时根据公式计算出课题组所提纯病毒的浓度为 14.02mg/mL。

寄主植物受病毒侵染后所发生的细胞超微病理变化，尤其是内含体的形态结构也是诊断鉴定的重要依据。《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》课题实施中也采用了这一方法。许多研究表明至少有 19 个病毒科或属的成员产生不同的内含体，可以与其他科或属区分开来，最典型的如烟草花叶病毒属的结晶体和 X-体、花椰菜花叶病毒属的病毒基质等。有些植物细胞病理特征甚至可应用于区别病毒的种或株系，如番茄花叶病毒在细胞内形成角层状聚集体，不产生 X-体，与同属的 TMV 等有明显区别。雪菜病毒 TuMV 具有马铃薯 Y 病毒属所特有风轮状内含体的细胞学特征，这为本课题对雪菜病毒 TuMV 的检测和鉴定提供了依据。

二、利用病毒分离物摩擦接种鉴别寄主，观察其反应

鉴别寄主反应按常规汁液摩擦接种方法进行，鉴别寄主有青菜（*Brassica chinensis*）、大白菜（*Brassica pekinensis*）、牛心甘蓝（*Brassica oleracea*）、萝卜（*Raphanus sativus*）、雪里蕻（*Brassica juncea* Coss. Var. *multiceps*）、黄瓜（*Cucumis sativus*）、心叶烟（*Nicotiana glutinosa*）和昆诺藜（*Chenopodium quinoa*）8 种植物。不同寄主的反应及症状见表 3－1。鉴别寄主反应是鉴别病毒种类常用的辅助方法。TuMV 一般侵染十字花科、藜科和茄科等，而不侵染瓜类。而 CMV 都可侵染这 8 种作物。根据鉴别寄主的反应，可初步判断雪菜，可能受 TuMV 侵染，而没受 CMV 和 TMV 的侵染。

表 3－1　病毒分离物 NBXC 在寄主上的反应

寄主植物	症状
青菜（*Brassica chinensis*）	SM
萝卜（*Raphanus sativus*）	SM
雪里蕻（*Brassica juncea* Coss. Var. *multiceps*）	SM
牛心甘蓝（*Brassica oleracea*）	LA，Y
大白菜（*Brassica pekinensis*）	LA
黄瓜（*Cucumis sativus*）	-
心叶烟（*Nicotiana glutinose*）	LN
昆诺藜（*Chenopodium quinoa*）	SC

LA，隐症带毒 latent；LN，局部枯斑 local lesion；SC，系统褪绿斑 systemic chlorosis；SM，系统花叶 systemic mosaic；Y，黄化 yellowing；-，不侵染 no infection

三、利用 IC-RT-PCR 对病毒的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因进行克隆和序列的测定

（一）cDNA 合成

采用免疫捕获反转录 PCR（IC-RT-PCR）方法扩增基因（施曼玲等，2002），操作步骤如下：在 0.5mL 的 PCR 管中加入 100μL 用包被缓冲液 1∶100 倍稀释的 TuMV 抗血清，4℃吸附过

夜，用 PBS 及 dH_2O 洗涤后，加入 500μL TuMV 病叶研磨液（用 PBS 研磨），37℃吸附 3h，用 PBS 及 dH_2O 洗涤，加入 9μL dH_2O 和 1μL PA 引物，72℃处理 2min 后置冰面上，然后加入 15μL cDNA 合成混合液（5μL ddH_2O，5μL 5 × RT-buffer，2.5μL 100mmol/L DDT，1.5μL 25mmol/L dNTP 和 1μL 反转录酶），42℃合成 1h 后，72℃处理 10min。

（二）PCR 扩增

根据已发表的 TuMV 基因序列，设计并合成 *CP* 和 *HC-Pro* 基因特异性引物：

1. *CP* 基因

3′引物：5′-TACAACTTCATAACCCCTT/GAACGC-3′

5′引物：5′-GCAGATGAAACGCTTGACGCAG-3′

2. *HC-Pro* 基因

3′引物：5′-ATGAGCTCGCASSDGGMGCCAACTTYTGGAAAG-3′

5′引物：5′-TTGTCGACATGAGTGTCCTCCCATTCTGTTCC-3′

（1）反应体系如下：

取 0.5mL PCR 薄壁管，依次加入以下试剂：

10 × 反应缓冲液	5μL
dNTP 混合物，10mM	1μL
5′引物，20μM	1μL
3′引物，20μM	1μL
cDNA 产物	10μL
Taq DNA 聚合酶，5U/μL	0.5μL

加双蒸水至终体积为 50μL。

（2）反应参数：

94℃预变性 2min 后开始以下循环反应：

94℃变性 45sec，50℃（*CP* 基因）或 53℃（*HC-Pro* 基因）退火 45sec，72℃延伸 90sec，35 个循环后 72℃继续延伸 10min；

（3）PCR 结束后，取 10μL PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖电泳。

（三）PCR 产物纯化

用 QIAquick Gel Extraction Kit 从胶中回收目的 DNA 片段，操作如下：

（1）用一干净锋利刀片从凝胶上割取目的条带；

（2）加入 3 倍胶体积的 QG 缓冲液；

（3）50℃温育 10min，不时摇匀，使凝胶溶解；

（4）加入 1 倍胶体积的异丙醇，混匀；

（5）将以上样品装上 QIAquick 离心柱，13 000r/min 离心 1min；

（6）弃滤液，加 0.5mL QG 缓冲液，13 000r/min 离心 1min；

（7）用 0.75mL PE 缓冲液洗柱，13 000r/min 离心 1min，弃滤液；

（8）再 13 000 r/min 离心 1min；

（9）加入 50μL EB，放在 37℃ 培养箱内静置 4min 后，13 000r/min离心 1min，收集滤液即为 DNA 片段溶液，取适量溶液电泳，估计其浓度。

（四）目的片段连接

本研究通用的反应体系如下：

外源 DNA 片段	7.5μL
p GEM-T easy vector	1μL
10×连接缓冲液	1μL
T4 DNA 连接酶（3 u/μL）	1μL

置 4℃，连接过夜。

（五）感受态细胞制备方法（TB 法）

（1）取 -70℃冻存的 *E. coli* DH5α 或 BL21（DE3）pLysS 细胞在 LB 平板划线后培养于 37℃，至菌落直径约为 1～2mm；

（2）取 8～10 个菌落接种于 250mL SOB 液体培养基，18℃剧烈振荡培养至 $A_{600}=0.6$；

（3）将培养物置冰上冷却；

（4）将培养物转移至 250mL 灭菌离心管，4℃3 000r/min 离心 10min；

（5）用 80mL 预冷的 TB 缓冲液悬浮细菌沉淀，冰浴 10min；

（6）4℃3 000r/min 离心 10min；

（7）用 20mL TB 悬浮沉淀，加入 DMSO 至终浓度为 7%，轻轻旋转混匀，冰浴 10min；

（8）将感受态细胞以每管 400μL 分装于 1.5mL 离心管中，并立即于液氮或 -70℃冰箱保存，备用。

（六）转化

（1）取一管低温保存的感受态细胞室温融化，取 200μL 分装于 1.5mL 离心管，置冰上；

（2）加入 5μL 连接产物，轻轻混匀，冰浴 30min；

（3）42℃热击 30sec 后迅速冰浴 2 ~5min；

（4）加入 800μL SOC 培养液，37℃振荡培养 1h；

（5）取 200μL 培养液涂布于麦康凯培养基（含 100μg/mL 氨苄青霉素），37℃培养至红、白斑区分明显为止。

（七）菌落 PCR

吸取少量的白斑菌落作反应模板，PCR 反应体系为 25μL，反应参数同上。反应完毕后，从 PCR 产物中取 10μL，电泳检查扩增结果。

（八）重组质粒的提取纯化（用 V-gene Kit）

（1）用离心管收集 4mL 在 LB 培养液中培养过夜的菌液，12 000r/min 离心 30sec，弃尽上清；

（2）在 250μL 已加入 RNase A1 的 S1 溶液中充分悬浮细菌沉淀，悬浮在旋涡混合器上进行；

（3）加入 250μL S2 溶液，温和地上下翻转离心管 4 ~6 次，使菌液充分混匀，此步骤不宜超过 5min；

（4）加入 400μL S3 溶液，温和地上下翻转离心管 8 ~10 次，室温静置 2min，12 000r/min 离心 10min；

（5）吸取上清液装入 DNA-Pre Tube 中，5 500r/min 离心 1min；

（6）弃滤液，加入 500μL W1 溶液，5 500r/min 离心 1min；

（7）弃滤液，加入 700μL 已加入无水乙醇的 W2 溶液，5 500r/min离心 1min；

（8）以相同的方法再用 700μL W2 溶液洗涤 1 次；

（9）弃滤液，再 12 000 r/min 离心 1min；

（10）将 DNA-Pre Tube 置一洁净 1. 5mL 离心管中，在膜中央加 50μL Eluent 溶液（预先 60℃ 温育 5min），室温静置 1min，12 000 r/min 离心 1min，洗脱 DNA。

（九）酶切鉴定

取 0. 5mL eppendorf 管，依次加入以下试剂：

DNA	1μg
限制性内切酶	5U
10X 酶反应缓冲液	2μL
加 ddH_2O 至	20μL

37℃酶切消化 2h 后琼脂凝糖胶电泳检查结果。

（十）TuMV *CP* 和 *HC-Pro* 基因的序列测定与分析

用 ABI PRISM TM3700 DNA 测序仪进行 *CP* 和 *HC-Pro* 基因的序列测定。测序结果用 NCBI（National Center for Biotechnology Information）和 DNA star 软件进行分析。

利用 IC-RT-PCR 扩增 TuMV 分离物 NBXC 的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因，PCR 扩增产物大小分别为 0. 85kb 和 1. 4kb，与预期的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因大小相吻合。

回收雪菜 TuMV 分离物 NBXC 的 *CP* 和 *HC-Pro* 两基因的扩增片段，进行克隆、筛选，获得数个阳性克隆，分别随机挑取 2 个阳性克隆进行序列测定，结果 *CP* 基因 2 个克隆的序列一致，基因全长为 864 个碱基，编码 288 个氨基酸（图 3 – 2）；*HC-Pro* 基因 2 个克隆序列也一致，全长为 1 374个碱基，编码 458 个氨基酸（图 3 – 3）。*CP* 和 *HC-Pro* 基因序列在 NCBI 的 GeneBank 上的登

录号分别为 AJ831813 和 AJ831798。选择 GeneBank 上登录 TuMV 其他的 9 个分离物与 NBXC 进行比较，NBXC 的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因核苷酸序列与它们的同源性分别为 90.0% ~98.3% 和 82.2% ~96.9%，氨基酸序列同源性则为 95.8% ~99.3% 和 95.6% ~99.3%（表 3 – 2）。根据 *CP* 和 *HC-Pro* 基因的核苷酸序列与 TuMV 其他分离物的同源性差异构建了系统进化树（图 3 – 4 和图 3 – 5，关系树中以 AJ439544-pvy 作种外对照）。在 *CP* 核苷酸序列的系统进化树上，NBXC 与来自中国萝卜的 TuMV 分离物 HRD 亲缘关系最远，与日本大白菜的分离物 Ka1J 和 Tu-2R1 亲缘关系最近；而在 *HC-Pro* 核苷酸序列的系统进化树上，NBXC 与来自甘蓝型油菜的英国分离物 UK1 亲缘关系最近，与来自萝卜及芸薹属的中国分离物 HRD 和 CHN1 亲缘关系最远。

表 3 – 2　NBXC 与其他 TuMV 分离物的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因核苷酸和氨基酸序列的同源性

分离物	同源性（%）				基因库登录号
	CP		*HC-Pro*		
	nt（%）	aa（%）	nt（%）	aa（%）	
NZ290	96.8	97.9	86.7	97.8	AB093612
Ka1J	98.1	99.3	94.5	98.0	AB093624
C42J	97.9	99.0	96.6	98.9	AB093625
CHN1	95.0	96.9	82.2	95.6	AB093626
HRD	90.0	95.8	82.4	95.9	AB093627
Tu-3	98.0	99.0	96.7	99.3	AB105134
Tu-2R1	98.3	99.3	94.8	98.7	AB105135
UK1	97.0	97.9	96.9	98.9	AB194797
TW	97.0	97.6	95.6	98.7	AF394602

四、利用 TAS-ELISA 对雪菜花叶病的病原进行检测

采用 TAS-ELISA 方法检测雪菜病叶中是否存在 TuMV 、CMV 和 TMV，病叶组织用包被液稀释（1g/10mL），操作步骤如下：

（1）适当浓度 TuMV 多克隆抗体血清包被 ELISA 板，37℃温育 2 h；

（2）用 PBST 洗 3 次，每次 3min；

（3）5% 的脱脂奶粉 37℃封闭 1h；

（4）加入抗原，4℃过夜；

（5）PBST 洗 3 次，每次 3min；

```
GCAGGTGAAACGCTTGACGCAGGTTTGACAGATGAGCAAAAGCAGGCGGAGAAGGAGAAGAAGGAGAGAGAGAAGGCAGAAAAGGAACGAGAGAGGCAGA 100
 A  G  E  T  L  D  A  G  L  T  D  E  Q  K  Q  A  E  K  E  K  K  E  R  E  K  A  E  K  E  R  E  R  Q
AGCAGTTGGCACTCAAGAAAGGCAAGAATGTTGCACAAGAAGAGGGAGAACGCGACAAGGAAGTGAACGCTGGAACCTCTGGAACTTTCAGTGTGCCCAG 200
K  Q  L  A  L  K  K  G  K  N  V  A  Q  E  E  G  E  R  D  K  E  V  N  A  G  T  S  G  T  F  S  V  P  R
ACTTAAGAGCCTGACAAGCAAGATGCGCGTGCCAAGATACGAGCAAAGAGTGGCTCTAAACCTCGATCATCTAATCCTATATACGCCAGAGCAGACGGAT 300
  L  K  S  L  T  S  K  M  R  V  P  R  Y  E  Q  R  V  A  L  N  L  D  H  L  I  L  Y  T  P  E  Q  T  D
CTATCCAACACACGTTCAACGCGAAAGCAGTTCGATACATGGTTTGAAGGTGTGATGGCTGATTACGAACTGACGGAGGACAAAATGCAAATCATTCTCA 400
 L  S  N  T  R  S  T  R  K  Q  F  D  T  W  F  E  G  V  M  A  D  Y  E  L  T  E  D  K  M  Q  I  I  L
ATGGTTTAATGGTCTGGTGCATTGAGAACGGAACCTCCCCGAACATAAACGGAATGTGGGTGATGATGGACGGCGATGATCAGGTGGAATTCCCGATCAA 500
N  G  L  M  V  W  C  I  E  N  G  T  S  P  N  I  N  G  M  W  V  M  M  D  G  D  D  Q  V  E  F  P  I  K
ACCGCTCATTGACCACGCCAAACCCACATTTAGGCAGATAATGGCCCATTTCAGTGACGTAGCTGAAGCGTACATTGAAAAGCGTAACCAAGACCGACCA 600
  P  L  I  D  H  A  K  P  T  F  R  Q  I  M  A  H  P  S  D  V  A  E  A  Y  I  E  K  R  N  Q  D  R  P
TACATGCCACGATATGGTCTTCAGCGCAATTTAACCGACATGAGCTTAGCTCGATACGCGTTTGATTTCTATGAAATGACTTCTAGAACTCCAATACGTG 700
 Y  M  P  R  Y  G  L  Q  R  N  L  T  D  M  S  L  A  R  Y  A  F  D  F  Y  E  M  T  S  R  T  P  I  R
CGAGAGAAGCACACATCCAGATGAAAGTAGCAGCACTGCGTGGCGCAAATAACAATTTGTTCGGCTTGGATGGAAACGTTGGTACAACGGTAGAGAACAC 800
A  R  E  A  H  I  Q  M  K  V  A  A  L  R  G  A  N  N  N  L  F  G  L  D  G  N  V  G  T  T  V  E  N  T
GGAGAGGCATACGACCGAGGACGTTAATCGGAACATGCATAACTTACTTGGCGTTAAGGGGTTA 864
 E  R  H  T  T  E  D  V  N  R  N  M  H  N  L  L  G  V  K  G  L
```

图 3-2　TuMV 分离物 NBXC 的 *CP* 基因核苷酸及所编码的氨基酸序列

```
AGTGCAGGGGGAGCCAACTTTTGGAAAGGCTTCGACAGATGCTTTCTCGCATACCGTAGTGACAATCGCGAACATACATGCTATTCAGGGCTAGATGTTA 100
 S  A  G  G  A  N  F  W  K  G  F  D  R  C  F  L  A  Y  R  S  D  N  R  E  H  T  C  Y  S  G  L  D  V
CTGAGTGCGGCGAGGTGGCAGCACTGATGTGTTTAGCTATGTTCCCATGCGGAAAGATAACCTGCCCTGACTGTGTAACAGATAGTGAGCTATCCCAAGG 200
T  E  C  G  E  V  A  A  L  M  C  L  A  M  F  P  C  G  K  I  T  C  P  D  C  V  T  D  S  E  L  S  Q  G
ACAAGCAAGTGGACCATCTATGCAGCACAGGTTGACGCAGCTGCGCGATGTCATCAAGTCAAGCTACCCACGCTTCAAGCATGCAGTGCAGATACTAGAT 300
 Q  A  S  G  P  S  M  Q  H  R  L  T  Q  L  R  D  V  I  K  S  S  Y  P  R  F  K  H  A  V  Q  I  L  D
AGGTACGAGCAATCACTGAGCAGTACAAACGAAAACTACCAGGATTTCGCAGAAATCCAGAGCATAAGCGATGGAGTTGAGAAAGCTGCATTCCCACACG 400
 R  Y  E  Q  S  L  S  S  T  N  E  N  Y  Q  D  F  A  E  I  Q  S  I  S  D  G  V  E  K  A  A  F  P  H
TCAACAAGCTAAACGCAATATTGATCAAAGGGGCCACAGCAACAGGGGAGGAATTCTCGCAGGCTACGAAGCATTTGCTCGAGATAGCACGATATCTGAA 500
V  N  K  L  N  A  I  L  I  K  G  A  T  A  T  G  E  E  F  S  Q  A  T  K  H  L  L  E  I  A  R  Y  L  K
GAACAGAACTGAGAACATTGAGAAGGGTTCACTGAAGTCCTTTCGCAACAAGATTTCCCAGAAAGCGCACATCAACCCAACACTAATGTGCGACAACCAG 600
  N  R  T  E  N  I  E  K  G  S  L  K  S  F  R  N  K  I  S  Q  K  A  H  I  N  P  T  L  M  C  D  N  Q
CTCGATAGAAATGGAAATTTCATATGGGGTGAGAGAGGATACCATGCAAAACGATTCTTCAGCAACTACTTTGAGATAATCGATCCAAAGAAAGGCTACA 700
 L  D  R  N  G  N  F  I  W  G  E  R  G  Y  H  A  K  R  F  F  S  N  Y  F  E  I  I  D  P  K  K  G  Y
CCCAATATGAGACAAGAGTGGTACCAAATGGGTCACGGAAACTTGCAATCGGCAAACTAATAGTCCCAACGAACTTCGAAGTTCTAAGGGAACAGATGAA 800
T  Q  Y  E  T  R  V  V  P  N  G  S  R  K  L  A  I  G  K  L  I  V  P  T  N  F  E  V  L  R  E  Q  M  K
AGGCGAACCGGTAGAACCATACCCAGTAACAGTCGAGTGTGTGAGCAAATTACAGGGTGACTTTGTCCATGCATGTTGTTGTGTCACAACAGAATCAGGC 900
  G  E  P  V  E  P  Y  P  V  T  V  E  C  V  S  K  L  Q  G  D  F  V  H  A  C  C  C  V  T  T  E  S  G
GACCCAGTCTTGTCTGAAATAAAAATGCCAACCAAACACCATCTAGTGATTGGCAACAGCGGCGATCCAAAGTACATAGATCTTCCTGAGATCGAGGAGA 1000
 D  P  V  L  S  E  I  K  M  P  T  K  H  H  L  V  I  G  N  S  G  D  P  K  Y  I  D  L  P  E  I  E  E
ATAAAATGTACATAGCGAAAGAAGGTTATTGTTACATCAATATCTTCCTAGCTATGCTAGTAAATGTCAAGGAGTCGCAGGCAAAGGAGTTCACGAAAGT 1100
N  K  M  Y  I  A  K  E  G  Y  C  Y  I  N  I  F  L  A  M  L  V  N  V  K  E  S  Q  A  K  E  F  T  K  V
TGTTAGGAACAAACTAGTTGGCGAACTTGGCAAGTGGCCCACTCTGTTAGATGTAGCAACCGCTTGTTATTTCCTGAAAGTATTTTACCCAGACGTTGCT 1200
  V  R  D  K  L  V  G  E  L  G  K  W  P  T  L  L  D  V  A  T  A  C  Y  F  L  K  V  F  Y  P  D  V  A
AACGCTGAATTGCCACGCATGCTAGTGGACCATAAGACAAAGATAATTCATGTCGTTGATTCATATGGGTCACTGTCAACTGGATATCATGTCCTTAAGA 1300
  N  A  E  L  P  R  M  L  V  D  H  K  T  K  I  I  H  V  V  D  S  Y  G  S  L  S  T  G  Y  H  V  L  K
CAAACACTGTGGAACAACTCATTAAATTCACGAGATGCAATTTGGAGTCAAGCTTGAAACATTACCGCGTCGGA 1374
T  N  T  V  E  Q  L  I  K  F  T  R  C  N  L  E  S  S  L  K  H  Y  R  V  G
```

图 3-3　TuMV 分离物 NBXC 的 *HC-Pro* 基因核苷酸所编码的氨基酸序列

（6）加入适当浓度单克隆抗体，37℃温育 1h；

（7）PBST 洗 3 次，每次 3min；

（8）加入适当浓度的碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG，37℃温育 1h；

（9）PBST 洗 3 次，每次 3min；

（10）每孔加入 100μL 新配制的底物溶液，室温显色 30min 后，终止反应；

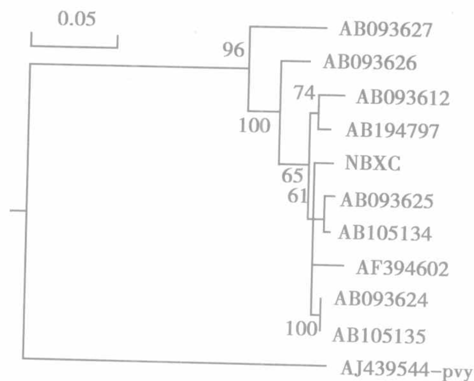


图 3-4　TuMV 分离物的 CP 基因核苷酸序列进化树

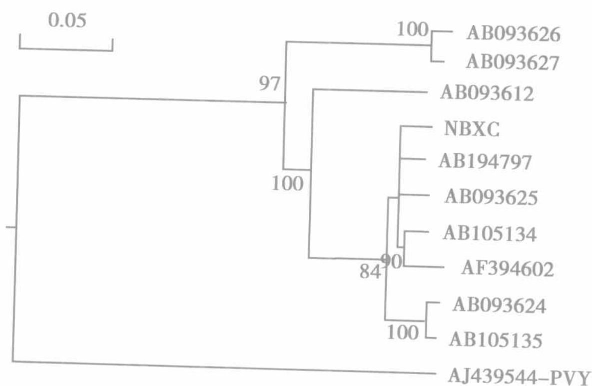
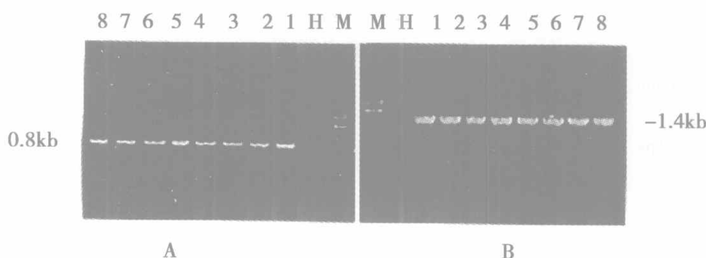


图 3-5　TuMV 分离物的 HC-Pro 基因核苷酸序列进化树

（11）酶联仪（BIO-RAD）上测 405 nm 的紫外吸收值，本实验中以 P/N >2. 1 作为阳性判断标准。

施曼玲利用 TAS-ELISA，对采集的 116 株样本进行了病毒检测，结果表明（见表 3 –3）：116 株样本中有 97 株病叶粗汁液能与 TuMV 抗血清呈阳性反应，占总样本的 83. 62%；所有样本的病叶粗汁液与黄瓜花叶病毒（CMV）和烟草花叶病毒（TMV）抗血清都呈阴性反应。利用 IC-RT-PCR 对随机选择的在 TAS-ELISA 中与 TuMV 抗血清呈阳性反应的 20 个病样进行了 TuMV 的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因扩增，所有 20 个样品中均能扩增出大小分别为 0. 8kb 和 1. 4kb 的条带，与预期 TuMV 的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因大小相吻合，而 2 株健康对照中无法扩增出任何条带，部分样品的扩增结果见图 3 –6。



M：1 000bp Markcr，1 –9：时间样本；H：健康对照

图 3 –6　TuMY 分离物的 IC – RT – PCR 检测

根据鉴别寄主生物学反应和电镜观察结果，判断引发浙江雪菜花叶病的病原是 TuMV。但为了进一步证实该判断的准确性，施曼玲还对病毒分离物 NBXC 的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因的 IC-RT-PCR 产物进行了克隆和序列测定。获得 *CP* 基因全长为 864 个碱基，*HC-Pro* 基因全长为 1 374 个碱基。*CP* 和 *HC-Pro* 基因的核苷酸及氨基酸序列与 TuMV 其他的分离物进行比较，核苷酸的同源性分别为 90. 0% ~98. 3% 和 82. 2% ~96. 9%，氨基酸序列同源性分别为 95. 8% ~99. 3% 和 95. 6% ~99. 3%。对照国际病毒分类委员会（ICTV）第七次病毒分类报告中明确规定的马铃薯 Y 病毒属

（*Potyvirus*）病毒种和株系的划分标准，*CP* 氨基酸序列同源性小于 85% 属于不同种类的病毒；大于 85% 则属于同种病毒的不同株系，完全可以确认雪菜花叶病的病原是 TuMV。TAS-ELISA 检测结果也证实雪菜花叶病是由 TuMV 引起，而没有受到 TMV 和 CMV 的侵染。

表 3－3　雪菜病样中 TuMV 的 ELISA 检测

分离物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
oD_{405}	0.153	0.567	0.194	1.025	0.998	0.151	0.959	1.321	0.626	0.615
分离物 isolate	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
oD_{405}	0.427	1.197	0.112	1.052	0.132	0.781	0.890	1.114	1.124	1.363
分离物 isolate	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
oD_{405}	0.923	1.185	0.145	1.225	0.472	0.188	0.645	0.176	0.731	0.515
分离物 isolate	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
oD_{405}	0.558	0.261	0.965	1.302	0.849	1.273	1.120	0.113	0.931	0.187
分离物 isolate	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
oD_{405}	1.061	0.197	0.379	1.192	0.860	1.162	0.765	0.254	0.164	0.304
分离物 isolate	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
oD_{405}	0.431	0.886	0.167	1.210	0.251	0.345	0.401	0.569	0.980	0.912
分离物 isolate	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
oD_{405}	0.955	0.116	1.264	1.117	0.746	0.147	1.053	0.816	0.418	1.056
分离物 isolate	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
oD_{405}	1.069	0.928	0.705	1.167	0.471	1.238	0.956	0.684	0.837	1.211
分离物 isolate	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
oD_{405}	0.741	0.312	1.154	0.184	0.680	1.150	1.248	1.120	0.819	1.183
分离物 isolate	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
oD_{405}	1.110	1.125	0.750	0.618	0.239	1.230	0.917	1.178	0.788	0.149
分离物 isolate	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
oD_{405}	0.820	0.447	1.203	1.066	0.618	0.539	1.247	1.097	0.191	0.997
分离物 isolate	111	112	113	114	115	116	ck			
oD_{405}	0.657	0.109	0.739	1.284	0.534	1.147	0.095			

第四章 芜菁花叶病毒的特征

芜菁花叶病毒（TuMV）是马铃薯 Y 病毒属（*Potyvirus*）的一个重要成员。*Potyvirus* 属病毒是一类由蚜虫以非持久性方式传播的线状病毒，包含 91 个正式种和 88 个暂定种，约占已知植物病毒的 36%，是植物病毒中最大并危害严重的一个属（Regenmortel MHV，2000）。在 *Potyvirus* 属中，TuMV 与马铃薯 Y 病毒（PVY）、大豆花叶病毒（SMV）和烟草蚀纹病毒（TEV）等都是生产上重要的作物病原，每年由该属病毒危害而造成的经济损失达数十亿美元（Word *et al.*，1991）。

1921 年美国 Gardner 等首次报道白菜上的 TuMV。在国内，凌立和杨演在 1941 年首先报道四川油菜花叶病是由 TuMV 引起，这是我国最早的有关 TuMV 的报道。TuMV 研究历史悠久，国内外都有大量的研究报道。20 世纪 90 年代以前的研究主要包括 TuMV 生物学特性、病原的诊断与检测、病害流行和防治等。近 10 多年来，TuMV 分子生物学的研究突飞猛进，在 TuMV 基因组结构和功能、株系变异与进化、寄主植物抗性以及抗病毒转基因工程等方面取得显著发展。

第一节 芜菁花叶病毒的普通生物学特征

一、寄主广泛

TuMV 是仅有的侵染芸薹属植物的 *Potyvirus* 属病毒，与该属其他病毒相比，TuMV 具有广泛的寄主范围，在人工接种条件下，TuMV 至少侵染 43 科 156 属 318 种双子叶植物，除十字花科外，还包括菊科、茄科、藜科、苋科、豆科和石竹科等，而且也侵染

单子叶植物（Shattuck，1992）。在自然条件下，主要寄主有十字花科的大白菜、小白菜、油菜、菜薹、芥兰菜、甘蓝、花椰菜、榨菜、雪菜、芜菁、萝卜等，此外，国内外还报道TuMV也侵染秋葵、青麻、荞麦、芝麻、菠菜、荠菜、蚕豆、豌豆、花生、扁豆、茼蒿、丝瓜、板兰根、繁缕、紫罗兰、车前草、补血草、二月兰和番红花等非十字花科植物。

TuMV在不同寄主植物上产生花叶、矮化和坏死等类型症状，早期病症主要为花叶和皱缩，后期植株矮化畸形，甚至枯死。藜科苋色藜和昆诺藜感染TuMV后表现为系统坏死，苋科的千日红和鸡冠花出现局部单斑症状，十字花科蔬菜一般表现为系统花叶、皱缩、坏死和落叶等症状，茄科的克里芙兰烟则出现系统坏死，洋酸浆出现接种叶局部斑、坏死等症状（陈集双等，1994）。不同的TuMV株系和分离物侵染植物的表现症状会有所差异。TuMV在不同类型油菜上的症状差异也很大。甘蓝型油菜苗期主要症状有枯斑、轮纹斑和点状枯斑，叶片叶脉网状褐色坏死，病株矮化、畸形、薹茎短缩，角果短小扭曲，严重的全株坏死。白菜和芥菜型油菜苗期主要症状为花叶和皱缩；后期植株矮化，叶片花叶、皱缩、茎秆有黑褐色条斑（蔡丽，2004）。

二、通过蚜虫和汁液以非持久性方式传播

在自然界，TuMV可通过蚜虫和汁液接触传播，不能通过种子方式传毒。目前已知至少有89种蚜虫可以非持久性方式传播TuMV，主要传毒蚜虫包括桃蚜（*Myzus persicae*）、甘蓝蚜（*Brevicoryne brassicae*）、萝卜蚜（*Hydaphis erysimi*）、棉蚜（*Aphis gossypii*）等。蚜虫获毒和传毒时间很短，都在1min内，传毒效率很高，萝卜蚜和桃蚜的传毒效率分别为82%和64%。有翅蚜迁飞的数量和时间对病毒的传播影响较大。但也有例外，如胡稳奇等报道发现不能通过蚜虫传播的TuMV株系（胡稳奇，1991）。周雪平等也报道了来源于豌豆的TuMV分离物不能通过桃蚜、豆蚜和豌豆蚜以非持久性方式传播（周雪平，1990）。有学者认为蚜虫

不传株系的植物中缺乏蚜虫传播所必需的辅助物质 HC（Help component，HC）（David *et al.*，1985）。侵染病毒在植物体内通过胞间连丝（短距离）和维管组织（长距离）移动扩散。TuMV 的体外抗性为：热钝化温度（TIP）为 55～62℃，体外存活期（LIV）约 3～4d，稀释限点（DEP）为 $2\times10^{-3}\sim5\times10^{-4}$。

三、TuMV 侵染植株后在细胞质中形成特有的风轮状内含体

TuMV 侵染植株后，病毒粒子存在于寄主细胞的细胞质中，并可在其中复制。内含体起源于胞内连丝和细胞膜的连接处，然后在细胞质中积累。光学显微镜下观察到受侵染的细胞中有不定形的内含体，电子显微镜下观察到细胞质中形成 *Potyvirus* 属所特有的形态各异的风轮状内含体，另外还有病毒粒子紧密排列的带状体。*Potyvirus* 属的病毒内含体按其形态的差异，可分为 4 个亚组。第一亚组是形成筒状或管状内含体；第二亚组是形成叠层风轮状的内含体；第三亚组是能形成上述二种形态，但其形成的叠层状长而直；第四亚组则是形成卷曲状的内含体，同时又形成较短小的卷曲片层状聚集体（Edwardson，1984）。大多数 TuMV 分离物的内含体皆为典型的第三亚组，即在横切面上同时具有风轮状、卷筒状和片层状聚集的结构，TuMV 的风轮状臂比较小、片层状聚集结构比较长。

四、TuMV 病毒变异大，株系分化明显

TuMV 是 RNA 病毒，易变异，且地理分布宽广，寄主植物多样，故 TuMV 株系分化复杂，目前尚缺乏统一完善的株系划分标准。传统的方法常根据鉴别寄主反应和寄主范围来进行 TuMV 株系的划分，但这种划分方法也不能完全反映实际的差异。

人们最早以鉴定寄主划分 TuMV 株系的努力是从 20 世纪 30 年代开始，30 年代和 40 年代都以 TuMV 在一种寄主植物上毒性强弱作为株系划分的标准，Tompkins 提出选用紫罗兰，Heclean

等以冰岛罂粟为寄主，Ponder 选择了甘蓝。1963 年 Yoshii 等首先根据 TuMV 分离物的寄主范围、病症表现和分离地进行株系划分，主要根据各分离物在甘蓝和心叶烟上的致病力强弱，把 TuMV 划分为 2 个株系：即普通株系和甘蓝株系，普通株系广泛分布世界各地，而甘蓝株系是强毒株系，重点分布在欧洲、美洲和澳洲。Provvident（1980）用从日本和中国获得的 46 个大白菜栽培品种，根据对 TuMV 抗性的差异，成功筛选出 9 个大白菜品种作为划分 TuMV 株系的鉴定寄主谱，并将美国纽约州大白菜和芜菁上的 TuMV 分离物划分为 C_1、C_2、C_3 和 C_4 4 个株系。亚洲蔬菜中心的 Green（1985），将 9 个大白菜品种简化为 4 个，即 PI418957、PI419105、Tropicial Deliht 和 Crusader，且用这 4 个大白菜品种对我国台湾十字花科蔬菜上的 TuMV 进行株系鉴定，结果除了鉴定出 C_1 ~ C_4 4 个株系外，还发现了 C_5 株系。1996 年，Jenner 等提出根据 TuMV 侵染一系列甘蓝型油菜的病症表现来划分不同的致病型，将各地的 124 个 TuMV 分离物划分为 12 个致病型。最常见的致病型有 3 种，分别是致病型 1、3 和 4。致病型 1 最普遍，包含 59 个分离物，不感染 Rape R4 和 Swede165 两个高抗油菜品种。致病型 3 和 4 都有 19 个分离物，致病型 4 可侵染所有的鉴别寄主，而致病型 3 只感染 Rape R4 品种。Jenner 认为油菜对 TuMV 的抗性是油菜显性抗性基因与 TuMV 致病型基因互作的结果，这种以甘蓝型油菜为鉴别寄主来划分 TuMV 致病型的观点也被普遍接受。

国内也作了大量有关 TuMV 株系分化的研究。从 1983 年开始，全国白菜抗病育种攻关协作组从 10 省市采集的 7892 份病样中，从中选出各地主流分离物 19 株。分别用 Provvidenti 和 Green 的 TuMV 株系鉴定谱，对 19 株 TuMV 主流分离物进行鉴定和归类，除确认 C_1、C_4 和 C_5 三个株系外，还有两类分离物不能按该标准归类。刘栩平等认为，我国十字花科蔬菜资源丰富，栽培地域广阔，生态地理差异显著，Provvidenti 和 Green 大白菜鉴别品种不能够反映我国 TuMV 株系分化实际差异也是正常的。因此根

据我国的实际情况，他们对芸薹属和萝卜属 94 个蔬菜品种进行筛选，获得包括结球白菜、不结球白菜、甘蓝、花椰菜和芜菁等 6 个蔬菜品种组成的新鉴别寄主，把我国 10 省（市）的十字花科 TuMV 划分成了 7 个株系，即普通株系（Tu_1）、小白菜株系（Tu_2）、海洋白菜株系（Tu_3）、大陆白菜株系（Tu_4）、甘蓝株系（Tu_5）、花椰菜株系（Tu_6）和芜菁株系（Tu_7）。冯兰香等（1990）对北京地区十字花科蔬菜包括大白菜、不结球白菜、萝卜、甘蓝和花椰菜上的 TuMV 进行鉴定，均获得 TuMV C_1 ~ C_5 5 个株系，C_4 为主要株系。李丽丽（1989）用 Provvidenti 的大白菜鉴别品种，对南方冬油菜的 TuMV 进行鉴定，确定了 CR_1、CR_2 和 CR_3 3 个株系，并对分布最广的 CR_1 株系的特性开展了研究。我国油菜上已发现 TuMV-CR_1 ~ TuMV-CR_{12} 共 12 个株系。王翠花等（1993）利用我国新筛选的 6 种鉴别寄主和株系划分方法，对山东大白菜 6 个 TuMV 分离物进行株系分化鉴定。鉴定结果表明引起山东大白菜病毒病的 6 个 TuMV 分离物同源于海洋白菜株系，根据同一株系在同一寄主上出现不同的侵染症状，确认 TuMV 6 个分离物存在着不同的侵染类型。这样归类，可以反映不同株系对相应十字花科蔬菜具有强或较强致病力的特性，为病害研究和抗病育种提供了便利。但是各种株系（或致病型）的原有划分标准都是针对不同作物的致病力进行的，主要受年份、环境和品种等因素的影响，没有真实反映出遗传和变异的具体情况，因此要进一步了解株系（或致病型）形成的原因及彼此间相关性，则必须从分子生物学角度来进行研究。

Jenner 等（1999）从血清学上把 TuMV 划分成不同的株系。近年来核酸序列分析及同源性比较已开始应用于 TuMV 株系（或致病型）研究。主要利用 *CP* 基因，3′-UTR 区段，*CP* 加 *P1* 基因序列进行分析，尤其是 *CP* 基因常用来鉴定 TuMV 分离物。Sanchez 等（2003）根据 *CP* 基因序列的差异，将 60 个 TuMV 分离物划分成 2 个主要遗传类群：MB（多数是芸薹属分离物）和 MR（多数是萝卜属分离物）。另外还有 2 个其他类别，包括在芸

薹属（B）和萝卜属（R）之间（IBR）以及之外的类群（OBR），其中 MR 遗传类群与 JPN1 血清型有相关性。

五、寄主植物广泛存在抗性

许多抗性鉴定实验表明芸薹属中广泛存在对 TuMV 的抗性。如路文长等（1989）主持的全国白菜抗病育种攻关协作组从 1983～1989 年鉴定了 3 000多份大白菜资源对我国流行的 TuMV7 个株系的抗性，选出 28 份抗病材料，其中 5 份表现免疫和高抗。徐玲等（1990）应用芜菁花叶病毒基因型株系 TuMV-C_1、C_4 和 C_5 对 28 份较重要的中国大白菜品种及亲本材料进行抗性鉴定，筛选出 13 份免疫或高抗 TuMV-C_1 株系材料，9 份免疫或高抗 TuMV-C_4 株系材料，及 5 份高抗 TuMV-C_5 株系材料。徐立彬（1996）鉴定了 57 份大白菜原始材料对 TuMV-白-83-6 的抗性，选出高抗材料 10 份。王述彬等（2002）对 982 份不结球白菜种质资源对 TuMV 抗性进行鉴定，发现 9 份抗性材料。李丽丽等（1992）首次报道从我国 3 510 份油菜种质资源抗 TuMV 鉴定中，选出 42 份高抗性材料，但仅是对 TuMV-CR_1 株系的鉴定结果。近年，谢永俊（2001）对云南 317 份油菜种质资源进行抗病毒特征的鉴定，选出 3 份高抗品种。蔡岳松等（1990）检测了 140 份甘蓝材料对 TuMV 的抗性，得到 5 份高抗和 27 份抗病材料。李烨（2000）对萝卜品种资源筛选，也发现高抗材料。郑岩松等（2003）研究了芥蓝以及芥蓝与菜薹种间杂交后代对 TuMV 油菜株系的抗性，结果表明芥蓝对广州地区 TuMV 油菜株系具有近于免疫的抗性。芥蓝与菜薹种间杂交回交后代对 TuMV 的抗性受回交亲本影响很大，用抗病品种与杂交回交的后代，经 2 次选择后，已获得 16 个经济形状较好的白菜抗病品系。李新予等（1992）对全国收集的 658 份芥菜品种进行了对 TuMV 的抗性鉴定，结果获抗病品种 2 份、中抗 10 份、无免疫和高抗类型，鉴定表明品种间抗病性差异显著，变种间抗病性差异小。

在广泛筛选对 TuMV 抗性的寄主的研究基础上，人们又开始

从分子生物学角度对抗性遗传机制进行深入探索。目前有关TuMV寄主抗性基因的研究在拟南芥和芸薹属作物上取得较大进展。至今所发现的TuMV抗性基因主要在甘蓝型和其他类型油菜上分离到，如*TuRB01*、*TuRB02*、*TuRB03*、*TuRB04*和*TuRB05*，这5个抗性基因均已被图谱定位。另两个TuMV抗性基因*TuRB01b*和*Tu*分别来源于大白菜和莴苣。

我国十字花科蔬菜对TuMV抗性鉴定的研究，一般都采用人工摩擦接种观察病症表现来鉴定，免疫或高抗品种的筛选常用无症叶回接昆诺藜或苋色藜来判断是否带毒，也有报道采用ELISA法辅助检测。施曼玲等在雪菜抗病品种的鉴定中，不但运用传统的发病率和病情指数调查，而且还采用单克隆抗体建立的TuMV TAS-ELISA检测体系，该方法不仅检测的灵敏度高，而且提高抗病品种鉴定的准确性，避免人为判断的误差。

六、TuMV侵染对寄主生理生化特性的影响较大

植株感染TuMV后，体内会出现一系列生理生化性状变化，如病变细胞质内分布大量病毒粒子和内含体，叶绿体片层结构发育差，淀粉粒积累减少，后期畸形肿胀，膜结构破裂，酶系活性改变，引起代谢紊乱。徐均焕等（1996）研究了不同抗性榨菜品种在TuMV感染后的细胞超微结构，实验结果表明TuMV内含体在叶肉细胞内数量及形状因榨菜品种抗性的不同而有差异。陶月良等（2001）发现温州盘菜感染TuMV后，叶片的电导率和游离氨基酸含量明显升高，过氧化物酶、多酚氧化酶和超氧歧化酶活性也都出现了不同程度的提高，但叶绿素和游离脯氨酸含量明显下降。

植物感染病毒后，病毒蛋白在叶绿体内积累引起叶绿体的破坏，使叶绿体发育停滞、叶绿体变小、基质发育不良（郭兴启等，2000）。TuMV-CP可能作用于PSⅡ电子传递链，阻断光合传递链中的电子传递，活性氧的过量积累引起叶绿素降解，破坏叶绿体的结构和功能，这可能是直接影响寄主植物光合作用的一个

重要原因（付东亚等，2004）。

病毒的侵染也会使叶片的气孔导度、蒸腾速率下降，使得胞间 CO_2 不被利用（Clover *et al.*，1999；郭兴启等，2000）。洪健等（2002）研究发现受 TuMV 侵染的青菜和芥菜的光合速率、气孔导度、蒸腾速率、叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量均较对照植株均显著下降。

第二节　芜菁花叶病毒的分子生物学特征

芜菁花叶病毒（TuMV）在电镜下观察为线状粒体，长宽约为 720 nm × 15 ~ 20 nm，螺旋对称，螺距 3.4 nm，整个粒子由 95% 的外壳蛋白和 5% 的 RNA 构成，沉降为单一组分，沉降系数为 150S，在 $CaCl_2$ 中浮力密度为 1.31g，分子量为 3.0×10^6 ~ 3.5×10^6，其外壳蛋白为单一组分，有约 188 个氨基酸残基组成，单一多肽的蛋白亚基分子量为 3.2×10^7 ~ 3.4×10^7。TuMV 的紫外吸收特性具有典型的核蛋白紫外吸收曲线，其吸收峰的谷与顶分别在 245 nm 和 260 nm，$A_{260}/A_{280}=1.2$ 左右，这说明该病毒具有较低的核酸含量（胡廷章等，1995；赵乐荣等，2002）。

Nicolas 等 1992 年首次发表 TuMV 核酸全序列以来，到目前世界各地共有 92 个株系全序列发表。Genesbank 上已登录 TuMV 各分离物的核酸部分序列已达到近千条。国内，何庆芳等（1991）最早进行了 TuMV cDNA 的合成与克隆；孔令洁等（1992）克隆了 TuMV *CP* 基因并构建了植物表达载体；许建平（1994）、张耀洲（1996）、史锋（1999）等也分别克隆 TuMV 的 *CP*、*P1* 和 *HC* 基因并在大肠杆菌中表达。徐平等（1994）首次报导 TuMV 分离物的 *CP* 基因序列；邓晓东（2000）、陈炯（2002）、施曼玲（2002、2003、2005、2006、2007）、宋云枝（2005）、庄木（2006）以及蔡丽等（2007）相继报导 TuMV 白菜、盘菜、萝卜等分离物的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因序列。大量 TuMV 分离物核酸序列的研究，使得人们可能深入了解 TuMV 的遗传、

变异和进化。

一、TuMV 基因组的结构

TuMV 基因组由一条的单组分正单链 RNA 分子组成，长约 9798 ~ 9844 核苷酸（nt）（图 4 – 1）。5′端是帽状的单个双价相连的病毒编码 VPg 蛋白质分子，3′端由一个长度可变的 PolyA 构成，有一个单个开放式阅读框架（ORF），两翼是两个非转译区（UTR），在 5′ UTR 中有一个内在的核糖体进入位点（Basso *et al.*，1994）。单一开放阅读框可表达产生一个多肽前体，在 3 种编码病毒蛋白酶的作用下，共翻译和转录后翻译成如下 10 种成熟蛋白：第一蛋白 P1（分子量为 40kD）、辅助蛋白酶 HC-Pro（52kD）、第三蛋白 P3（40kD）、6K1 蛋白（6kD）、柱状包含体蛋白 CI（72kD）、6K2 蛋白（6kD）、病毒基因组连接蛋白 VPg（VPg，22kD）、小核包含体 a NIa（27kD）、小核包含体 b NIb（60kD）和外壳蛋白 CP（33kD）。这些蛋白的结构和功能成为近年来的研究热点。

UTR	P1	HC-pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP	UTR

图 4 – 1　TuMV 基因组结构图

二、TuMV 基因组的功能

TuMV 病毒基因组 RNA 有双重作用：一方面作为复制的模板，另一方面作为蛋白质翻译的 mRNA。这一过程的调控模式还没有合理的解释。病毒复制及翻译利用寄主的细胞器，但多聚蛋白的切割是由病毒编码的蛋白酶控制的，释放出来成熟的蛋白通常是具有多功能性的。

（一）P1 蛋白

开放式阅读框的第一个蛋白称为 P1 蛋白，1994 年 Soumounou

等通过实验证实 P1 蛋白具有与核酸结合的特性，而且一个 P1 蛋白分子不只结合一个 RNA 分子，它既可以结合 ssRNA，又可结合 dsRNA；它也能够结合 DNA，但仅与 ssDNA 有亲合力，而与 dsDNA 则不能结合。由于这一特性，P1 蛋白的功能可能是在 RNA 翻译中起作用，还可以通过改变胞间连丝允许物质通过的最大极限大小来调节细胞间核苷酸的转运。和其他马铃薯 Y 病毒属病毒类似，TuMV 的 P1 蛋白也是一个蛋白酶，从初生蛋白多聚体的 C′端开始，酶切保守的核苷酸酶切位点，生成蛋白多聚体。

（二）HC-Pro 蛋白

开放阅读框的第二个蛋白是 HC-Pro，它具有双重功能：作为蚜虫传毒的辅助成分和具有蛋白酶活性，它因此而得名。用^{125}I 标记提纯的 HC-Pro 饲喂蚜虫的实验表明，HC-Pro 和病毒的结合体集结在蚜虫的下颚针处，部分在消化道前方至肠，这种选择定向需要有 HC 协助完成，推测认为 HC 的功能是促使病毒颗粒与蚜虫的粘合（Berger，1986）。Nakashima 等（1993）发现蚜传和非蚜传的 TuMV 两株系 HC-Pro 氨基酸序列有 6 个氨基酸的差异，它们显然是和蚜虫传毒有关的关键氨基酸。Pirone 等（1996）发现 HC-Pro N′端富含半胱氨酸区域有一赖氨酸残基和 HC-Pro 中另一个被称为 PTK 残基是蚜虫传毒所必须的。不同的蚜虫种类与特异性 HC-Pro 互作的能力不同，导致蚜虫所传播和持毒的马铃薯 Y 病毒属病毒表现在种类和数量上的区别（Wang *et al.*，1998）。Dombrovsky 等（2005）研究认为蚜虫介体与 *Potyvirus* 属病毒之间的专化性是决定于蚜虫种类与 HC-Pro 以及 HC-Pro 与病毒粒子的亲和力；HC-Pro 也可能参与病毒外壳蛋白和蚜虫口针的接触，因而蚜虫对马铃薯 Y 病毒属病毒的传播也依赖于 HC-Pro 与 CP 蛋白 N′端的相互适应性。

RNA 沉默（RNA silencing）现象是真核生物细胞对外源遗传因子的一种特异性且高效的降解机制，在植物中 RNA 沉默也称为转录后基因沉默（post transcriptional gene silencing，PTGS）。dsRNA 是 RNA 沉默起始的关键分子，dsRNA 首先被 DICER

（RNA 酶Ⅲ样的核酸酶）降解为不同长度的小 RNA，一类是 miRNA（micro-RNA，miRNA）；另一类是 siRNA（small interfering RNA，siRNA），这些小 RNA 整合到 RNA 诱导的沉默复合体（RNA-induced silencing complex，RISC）中，并促使 RISC 降解同源 mRNA 或抑制翻译。针对寄主本身的 PTGS 防御机制，病毒在与寄主长期进化过程中也产生了能克服这种防御反应的办法，即许多病毒编码 RNA 沉默的抑制子（suppressor）。HC-Pro 就是一种 RNA 沉默机制的有效抑制子，HC-Pro 干扰 siRNA 的积累，也改变 miRNA 的积累量，因而影响 siRNA 和 miRNA 的功能和生物合成（Hamilton *et al.*，2002）。HC-Pro 可能通过抑制沉默复合体 RISC 的形成来抑制沉默（Kasschau *et al.*，2003），HC-Pro 还可通过与植物钙调素相关蛋白（rgs-CaM）互作干扰 RISC 的形成。HC-Pro 既能抑制沉默的建立，又能恢复已建立的沉默，所以可能在 RNA 沉默的维持阶段起作用（Llave *et al.*，2000）。

HC-Pro 还具有调控病毒在胞间运动的功能（Rojas *et al.*，1997；Ohshima，1999），与植物病毒病的症状形成密切相关。表达 TuMV *HC-Pro* 基因的转基因拟南芥出现类似 dcl1 突变体（DCL1 丧失功能突变体）的表型。在转 *HC-Pro* 基因或 TuMV 侵染的拟南芥中，HC-Pro 都抑制了 miRNA 介导的调控，在 miRNA 产生的下游起作用，使 miRNA 的目标 mRNA 过度表达。miRNA 目标基因的过度表达可能在 dcl1 突变体、*HC-Pro* 转基因植物以及 TuMV 侵染的植物中引起类似的发育缺陷（Kasschau *et al.*，2003）。

（三）P3 蛋白

开放阅读框的第三个蛋白是 P3 蛋白，和其他蛋白不同，其序列高度可变。其他几种 *Potyvirus* 属病毒的 P3 蛋白和致病性及症状的决定有关（Dallot *et al.*，2001）。甘蓝型油菜品系 165 具有对 TuMV 致病型 1 和致病型 3 的抗性，但 P3 蛋白突变体在 165 品系上诱导超敏反应（坏死），P3 蛋白的突变使 TuMV 克服了甘蓝型油菜的抗性基因而使侵染发生（Jenner *et al.*，2002）。Jenner

等后来研究发现 P3 蛋白是针对 TuMV 抗性基因 TuRB03 和 TuRB04 的无毒因子，P3 蛋白 C′端一半的基因序列与 TuMV 在芥菜上的病症表现密切相关（Jenner *et al.*，2003）。P3 蛋白不仅影响病毒的积累，而且影响病毒在细胞内的长距离移动。P3 蛋白是 TuMV 侵染过程的一个重要因素，并且是 TuMV 寄主范围的决定因子，它决定 TuMV 对芸薹属和（或）萝卜属的侵染（Suehiro *et al.*，2004）。

（四）6K1 蛋白

Potyvirus 属的 6K1 蛋白是由蛋白多聚体 C′端一个蛋白酶切割位点释放出来的，其作用机理不是很清楚，可能和 P3 蛋白活性的调节有关（Dallot *et al.*，2001）。

（五）CI 蛋白

圆柱状内含体蛋白 CI 是根据 TuMV 在被感染的植物细胞内形成了圆柱状内含体结构来命名的。柱状内含体蛋白形态结构上的差异是由病毒分离物序列上的差异所决定（McDonald *et al.*，1975）。马铃薯 Y 病毒属的 CI 最先在胞间连丝内形成，病毒在细胞间的转运过程中，胞间连丝起着重要的作用。CI 蛋白的 N′端 103-119 和 224-237 两氨基酸残基处，存在 TuMV 与 ZYMV（Zucchini yellow mosaic virus）交叉反应的两个抗原表位；TuMV 交叉反应和主要病毒特异性抗原表位分别占了 CI 蛋白 N′端的一半（Kundu *et al.*，2000）。N′端也饱含解旋酶超家族 2 中典型的 DEXH 基序。3′~5′解旋酶活性可以解开双链 RNA（Lain *et al.*，1990），这对病毒的复制极其关键（Klein *et al.*，1994）。

TuRB01 是目前已知存在甘蓝型油菜上的 TuMV 抗性基因之一，CI 蛋白编码区单个核苷酸诱发或自发突变的 TuMV 突变体，都获得了对有 *TuRB01* 抗性基因的芸薹属植物的新侵染能力。这两种突变体均引起 CI 蛋白 C′端 1/3 氨基酸的改变，而 CI 上别的保守序列是与内含体形成以及病毒胞间移动相关（Jenner *et al.*，2000）。甘蓝型油菜品系 165 具有对 TuMV 致病型 1 和致病型 3 的

抗性，而 CI 蛋白突变体在 165 品系上诱导系统性侵染，可见 CI 蛋白的突变使 TuMV 战胜甘蓝型油菜的抗性基因 *TuRB05* 而使侵染发生。因此说 CI 蛋白是 TuMV 病毒与具有抗性基因的寄主互作的决定性因子，是针对 TuMV 抗性基因 *TuRB01*、*TuRB01b* 和 *TuRB05* 的无毒蛋白（Jenner *et al.*，2002）。

TuMV 有两种寄主类型，一个是 BR 寄主类型，它都能系统性侵染芸薹属和萝卜属，而 B 寄主类型只系统侵染芸薹属，而不能侵染萝卜属。B 寄主类型的 TuMV 突变体表现出对萝卜属的侵染，突变体的基因组序列分析表明，39 个变异核苷酸中有 4 个是与这种 B 寄主类型 TuMV 对萝卜属的适应密切相关，这 4 个核苷酸被鉴定出分别在 P1、P3、CI 以及 VPG 蛋白基因上，显然这些基因位点在 TuMV 最初对萝卜寄主的适应上发挥重要作用（Tan *et al.*，2005）。

（六）6K2 蛋白

TuMV 病毒 6K2 蛋白的功能是和膜结合有关（Restrepo-Hartwig *et al.*，1994），从 VPg/NIa 中不完全的切割会导致 VPg 重新进入复制复合体（Restrepo-Hartwig *et al.*，1992）。6K2 蛋白和 VPg 蛋白也参与胞膜上复制复合体的活动（Dreher，1999）。

（七）VPg 蛋白

病毒基因组相关蛋白 VPg（Virus genome-linked protein）位于 NIa－pro 的末端，VPg 蛋白是通过磷酸二脂键的酪氨酸残基共价结合的方式重新进入复制复合体，它在正负链中都存在。VPg 蛋白通过激活 NIb 多聚酶，参与对应链的合成（Fellers *et al.*，1998）。它也参与寄主拟南芥翻译真核起始结合因子 eIF（iso）4E 的过程（Wittmann *et al.*，1997）。eIF（iso）4E 与 mRNA 的帽子结构结合，在翻译起始的调控中起重要作用，VPg 与细胞 mRNA 竞争与 eIF（iso）4E 的结合。Lellisd 等筛选到对 TuMV 感病性下降甚至表现为免疫的拟南芥突变体，感病性下降有关基因位点被克隆并证实是编码 eIF（isо）4E 的基因（Lellis *et al.*，

2002)。有研究证实 eIF（iso）4E 缺陷型的拟南芥与野生型的形态和生殖能力都一样，可见 eIF（iso）4E 对植物生长是可有可无，但对病毒侵染是必须的。后来的研究发现 VPg 还能与拟南芥真核起始结合因子 eIF（iso）4E 的异构体 eIF4E，以及小麦中的 eIF（iso）4E 结合。这种互作范围定位在 VPg 的一段 35 个氨基酸的片断，若该区域内的一个天门冬氨酸残基被替代，则就不发生互作（Lenonard *et al.*，2000）。

VPg 和 6K2 的多聚蛋白与内质网膜相联结，这是 VPg 与 eIF（iso）4Ee 或 eIF4E 互作的形式。在植物中互作是在 6K2 - VPg - Pro/ VPg - Pro 与 eIF（iso）4E/eIF4E 之间进行，植物中的 poly（A）结合蛋白（PABP）也参与互作，可在 TuMV 的 VPg 周围形成一个多蛋白复合体（Lenonard *et al.*，2004）。TuMV 在缺失 eIF4E 的拟南芥突变体上增殖，但不能在缺失 eIF（iso）4E 突变体上增殖（Sato *et al.*，2005）。TuMV 的 VPg 与拟南芥的 eIF（iso）4E 互作的生物学意义是它们在 TuMV 侵染拟南芥的过程中的一个关键性因素，是病毒侵染所必须的，并能上调节基因组复制（Duprat *et al.*，2002）。

在一些植物如豌豆、拟南芥和本氏烟上都存在一个富含半胱氨酸的特异性植物蛋白能与 VPg 互作，称为 *Potyvirus* 属 VPg 互作蛋白（PVIP）。它们的互作是靠近 VPg 的 N 端，N 端的 16 个氨基酸对这种互作是必须的，并且至少与 1 个 PVIP 作用。在 VPg 与 PVIP 的互作中，PVIP 起辅助作用，通过加强 TuMV 病毒在胞间的移动，来增强病毒侵染力并影响寄主的系统症状（Dunoyer，2004）。

（八）NIa 蛋白

第一个核酸内聚体蛋白 NIa（nuclear inclusion protion a），是负责 TuMV 多聚蛋白体切割的蛋白酶，它以水解的方式剪切多聚蛋白上 9 个连接位点中的 7 个，其中 P3-6K1-CI 方向是顺式切割，CI-6K2-VPg-NIa-Nib 方向是反式切割。7 个剪切位点的氨基酸序列都有三个保守的氨基酸：在 P4、P2 和 P1 位点上分别是 V、H

和 Q（Yoon *et al.*，2000）。Kang 等（2001）从随机的序列文库中获得 NIa 蛋白酶剪切的氨基酸序列，通过 GASP（genetic assay for site-specific proteolysis）统计分析，推导出的 NIa 蛋白酶所水解的特异性底物的序列：Yaa-Val-Arg-His-Gln-Ser，Yaa 是一个脂质氨基酸，在 Gln 与 Ser 之间有个易断裂键。

NIa 是一个半胱氨酸蛋白酶，其结构和功能和类似胰凝乳蛋白酶的丝氨酸蛋白酶有关。NIa 和 VPg 一起组成一个 49kDa 蛋白（Laliberte *et al.*，1992），它自身是以 27kDa 形式存在的，没有 C-末端就是 25kDa 形式（Kim *et al.*，1996a）。第三个内切酶位点减少 C-端 36 个氨基酸，也会降低蛋白酶活性的（Kim *et al.*，1996b）。这种内部切割可能代表了蛋白酶的一种不稳定性，或者在病毒生命周期中参与了蛋白的水解调控（Kim *et al.*，1996，2000）。NIa 蛋白水解的动力学和低的适宜温度（15℃）暗示它有高度可变异的结构。NIa 蛋白大部分存在于细胞核中，这种定位可能是作为一种从胞膜失活的方式（Kim *et al.*，2000）。

（九）NIb 蛋白

第二个核酸内聚体蛋白 NIb（nuclear inclusion protion b）是病毒的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRp），饱含 3 个高度保守区域，针对这 3 个保守区域（Liu *et al.*，1999）已开发了单克隆抗体。*Potyvirus* 属病毒的 NIbs 蛋白利用 3′UTR（甚至可以是异源的）产生互补的（反义）RNA（Teycheney *et al.*，2000）。

在蚜虫取食期间，TuMV 由蚜虫以非持久性方式传入植物细胞体内。一旦进入细胞体内，病毒粒子就进行脱壳和基因组复制。首先是产生负链，接着产生正链。由于寄主的 RdRp 仅产生短片段的小分子，所以正链 RNA 病毒都需要编码自己的 RdRp。解旋酶活性也要求移除模板的二级结构，解开由模板和新合成链形成的双链体。在 *Potyvirus* 属中这两个功能是分别由 NIb 和 CI 蛋白提供的。正链 RNA 病毒基因组 3′末端序列负责模板的特异性，阻止寄主 mRNA 在病毒中的增殖（Dreher，1999）。

（十）CP 蛋白

外壳蛋白 CP（coat protein）是 ORF 编码的最后一个蛋白，它包裹病毒的核苷酸。CP 的 N′端区域和 P1、P3 蛋白是 TuMV 基因组中最易变异的三个区域（Shukla *et al.*，1994）。Kantrong 等（1993）研制了针对蚜传和非蚜传的 TuMV 株系单克隆抗体，蚜传和非蚜传的单克隆抗体除了共同识别两个相同的抗原表位外，还能分别识别在 TuMV 两株系 CP N′端的两个不同特异性的抗原表位，蚜传和非蚜传的 TuMV 两株系 CP 的 N′端有 6 个氨基酸的差异。CP N′端第 8 位点上的氨基酸残基在单克隆抗体与 CP N′端特异性的结合中起关键作用，后来发现这氨基酸残基是个保守的氨基酸基序（DAG），DAG 可以用血清学方法辨别的（Kantrong *et al.*，1995）。DAG 参与了外壳蛋白和辅助成分（它和蚜虫的口针结合）的结合，因此 CP 对蚜虫的传毒很重要（Pirone *et al.*，1996）。*Potyvirus* 属病毒的 CP 也参与病毒在植物胞间以及长距离的运动。另外它也能增加胞间连丝允许通过物质的最大极限的大小，从而调节病毒 RNA 在细胞与细胞间的运动（Rojas *et al.*，1997）。

三、TuMV 基因组的变异

TuMV 基因组的变异可能由点突变（Jenner *et al.*，1996）和重组（Chen *et al.*，2002；Ohshima *et al.*，2002；Harrison，2002）引起。RNA 聚合酶缺乏 3′～5′核酸外切酶的阅读校正活性，这样单链基因组上不能进行错配修复，导致存在相对较高的错参率，一般每个复制循环每 10kb 分子就要 0.1～10 个发生突变（Domingo *et al*，1997）。另一个可能是 TuMV 基因组的 5′端区域内发生了复制滑动（Hancock *et al.*，1995）。TuMV 能较快地发生变异可能就是它能侵染很多寄主的原因，TuMV 变异类型是通过复制错误和寄主基因型选择压力的平衡来维持的。

Ohshima 等（2002）研究了 76 个来自世界各地的芸薹属和萝卜属以及其他作物上的 TuMV 分离物的 *P1* 和 *CP* 基因变异情况。

寄主鉴定把它们分为二组致病型：芸薹组（B）和芸薹萝卜组（BR）。1/10 的分离物基因组被发现是重组，许多分离物 P1 蛋白的 5′端 300 个核苷酸出现变异，但 *CP* 基因 3′端 380 个核苷酸几乎是保守。在系统关系树上，这些分离可分 4 个组。“basal-B”组是由 8 个 B 致病型分离物构成。它们都易变异，不是单起源的，并且都来自欧亚大陆的西南和中部的芸薹或非芸薹属作物。与这一组最近的是“basal-BR”组，也是易变异的，是由 8 个 BR 致病型的欧亚分离物组成。第三个也是最少变异的组是“Asia-BR”，共有 22 个 BR 致病型分离物，其中大多数来自东亚特别是日本，寄主大多数是萝卜。第四组，“World-B”，有 36 个分离物，来自各大陆，几乎是来自芸薹属的 B 致病型。Ohshima 认为世界各地的 TuMV 的变异进化可能就像它的芸薹属寄主一样，先出现在欧洲，然后传播到世界各地，而近来 BR 型致病型也开始在东亚进化。TuMV 分子的起源进化可能是寄主适应、基因重组和地理分布等综合因素作用的结果。

Tomimura 等（2003）对来自世界各地的 38 个 TuMV 分离物基因组全序列的变异进行研究，至少 1/5 的序列是重组的。没有明显重组的序列形成一组，这些组与致病力差异以及起源相关，6 个来自欧亚非芸薹属的 B 致病型的分离物可能是 TuMV 种群的祖先，而新近出现种群分支是只在东亚发现的 BR 致病型分离物。8 个均来自东亚的分离物很明显表现出重组，可能是新近重组的结果，然而同样有 8 个来自世界各地的分离物明显是先前重组。38 个分离物基因组全序列的比较表明 TuMV 起源于欧亚大陆，并且新近在东亚出现新进化。

Tan 等（2004）分析了来自世界各地 89 个 TuMV 分离物的基因组全长 1/3 序列的变异情况。基因组 5′端 2/3 长的序列中发现了 18 个重组位点，而 3′端 1/3 序列中只发现 2 个。24% *P1* 和 35% *NIa-VPg* 基因序列重组，而只有 1% *NIa-Pro* 和 *CP* 基因重组。大多数 BR 型重组属于 Asian-BR 组，这可能来自于新近的迁移，然而大多数来自亚洲 B 型分离物划分到 World-B 组，并且这个组

绝大多数分离物是重组。一些重组位点只在某个特殊的谱系中发现，因而更像单个重组事件的后代，而不是发生在重组热点上多次重组的结果，可见，谱系间和谱系内的重组在 TuMV 自然种中普遍存在。

142 个来自欧亚的 TuMV 分离物基因结构，通过鉴定寄主范围和基因序列进行比较，大多数来自西欧亚大陆的分离物的寄主是芸薹属，相反来自东欧亚大陆的分离物既侵染芸薹属又侵染萝卜属。分析基因组 5 个区域上的重组位点发现基因重组位点也在其他的基因区域上，但 *P1* 基因比其他基因重组更频繁。核苷酸多样性表明，西欧亚亚群比东欧亚亚群更多样，但来自 Asian-BR 组的基因有一个更大的非同义/同义替换比率，特别在 *P1*、*VPg* 和 *NIa-Pro* 基因上，这些亚群似乎从欧洲祖先类群独立进化而来，它们的基因组结构也可能反映祖先的影响（Tomimura *et al.*，2004）。Tomitaka 等（2006）通过对 TuMV 东亚分离物的基因序列变异以及寄主差异的分析，发现大多数中国的芸薹属 TuMV 分离物只侵染芸薹属作物，但日本的芸薹属 TuMV 分离物既能侵染芸薹属又能侵染萝卜属。2000 年开始在日本九州岛发现了非重组的 basal-BR 组 TuMV 分离物，而这组分离物在中国没发现。Tomitaka 等研究认为中国和日本 TuMV 分离物是同一种群但是不连续的谱系。Ohshima 等（2007）通过对 92 个 TuMV 分离物的基因组全序列进行分析，发现只有 26% 的分离物没有重组，重组位点遍布基因组除 *6K1* 基因外的所有位置，最容易发生重组的基因位点是 *P1*、*CI*、*6K2* 和 *VPg*。大多数重组位点的上游区域富含 GC 碱基，下游区域则富含 AU 序列，重组在 TuMV 种群的进化中起了重要作用。

国内陈炯等（2002）最早对来自中国的 TuMV 分离物 *CP* 基因的变异进行研究，他们克隆了 10 个来自浙江的 TuMV 分离物的 *CP* 基因。系统关系树表明绝大多数 TuMV 分离物属于两个亲缘性较远的进化类群。分离物 B1 ~ B4 寄主为芸薹属植物，归入类群 1。而分离物 R1 ~ R6 来源于萝卜属，形成较小的类群 2。两个类

群间核酸序列同源性仅约为90%。蔡丽等（2007）对来源于湖北和安徽两省的18个TuMV分离物进行*CP*基因克隆和序列分析，依据Sanchez等分类方法，其中17个TuMV分离物属于MB类群，而另有一个萝卜分离物则属于MR类群。这与陈炯等的根据*CP*基因变异，把TuMV分离物划分为两大主要遗传类群的实验结论相似。宋云枝等（2005）和庄木等（2006）则分别按Ohshima等的分类方法进行TuMV分离物*CP*基因的克隆和序列分析，结果表明TuMV6个山东分离物和2个北京分离物都属于world-B组。

植物病原的分子变异是其生物学性状及致病性变化的内在原因，病原分子变异在基因组全序列上反映最为清楚，但由于全基因组测序需要花费大量的时间和资金，因而通常对病原的分子变异不是选择整个基因组而是选择其中的某个基因进行研究。为了解我国不同地理区域来源的TuMV分离物的基因组变异情况，以及我国与国外TuMV分离物之间的基因组差异，施曼玲等（2002、2003、2005、2006、2007）从浙江、安徽、江西、江苏、云南和广西等省市收集了21个TuMV国内分离物。18个TuMV国外分离物分别来自匈牙利、英国、丹麦、奥地利、尼泊尔和德国6个国家，各分离物的寄主、地理来源、*CP*和*HC-Pro*基因的GenBank登录号见表4－1和表4－2。利用RT-PCR扩增TuMV分离物*CP*基因和*HC-Pro*基因，PCR扩增产物大小都分别为0.85kb和1.4kb，与预期的*CP*和*HC-Pro*基因大小相吻合。已克隆的TuMV21个*CP*基因和36个*HC-Pro*基因序列已在GenBank上登录。

根据TuMV各分离物对不同寄主的侵染性差异，21个国内分离物分成2种致病型：B型（只侵染*Brassica*）和BR型（既侵染*Brassica*，又侵染*Raphanus*）。来自萝卜的4个分离物JX、YN2、ZJ1和ZJLB2人工接种芸薹属和萝卜属作物，都能产生花叶或轻花叶症状，所以属于BR致病型。其余17个TuMV国内分离物只在芸薹属作物上产生症状，因而归属B型。利用RT-PCR对21个TuMV分离物的*CP*和*HC-Pro*基因进行PCR扩增，扩增产物克隆后进行序列测定，结果显示所有TuMV分离物的*CP*基因全长均

表 4－1　芜菁花叶病毒中国分离物的来源、寄主和序列登录号

病毒分离物	*HC-Pro* 基因登录号	*CP* 基因登录号	寄主	采集地
AH	AJ831820	AJ831806	青菜 *Brassica chinensis* L.	安徽合肥
ZJ1	AJ831821	AJ831807	萝卜 *Raphanus sativus*	浙江杭州
HZLB2	/	AJ831808	萝卜 *Raphanus sativus*	浙江杭州
ZJ2	AJ831793	AJ831809	芜菁 *Brasscia rapa* L.	浙江杭州
ZJ3	AJ831794	AJ831810	乌塌菜 *Brassica narinosa*	浙江杭州
ZJ4	AJ831795	AJ831811	榨菜 *Brassica juncea* var. *tumida*	浙江杭州
JX	AJ831796	AJ831812	萝卜 *Raphanus sativus*	江西南昌
ZJ5	AJ831797	AJ576320	雪菜 *Brassica juncea* var. *multiceps*	浙江宁波
ZJ6	AJ831798	AJ831813	雪菜 *Brassica juncea* var. *multiceps*	浙江宁波
GX	AJ831799	AJ831814	青菜 *Brassica chinensis* L	广西南宁
ZJ7	AJ831800	AJ831815	榨菜 *Brassica juncea* var. *tumida*	浙江萧山
YN1	AJ831801	AJ831816	大白菜 *Brassica pekinensis*	云南元江
YN2	AJ831802	AJ831817	萝卜 *Raphanus sativus*	云南昆明
YNCQ1	AJ831803	/	青菜 *Brassica chinensis* L	云南昆明
YN3	AJ831804	AJ831818	青菜 *Brassica chinensis* L	云南昆明
JS	AJ831805	AJ831819	青菜 *Brassica chinensis* L	江苏宜兴
CZH1	AM931466	/	青菜 *Brassica chinensis* L	浙江杭州
CZH2	AM931467	/	榨菜 *Brassica juncea* var. *tumida*	浙江杭州
WZ	AJ314826	/	盘菜 *Brasscia rapa* L	浙江温州
ZJZC	/	AJ576321	榨菜 *Brassica juncea* var. *tumida*	浙江桐乡
ZJXC	/	AJ576320	雪菜 *Brassica juncea* var. *multiceps*	浙江宁波

表 4－2　芜菁花叶病毒外国分离物的来源、寄主和序列登录号

病毒分离物	*HC-Pro* 基因登录号	*CP* 基因登录号	寄主　、	国家
A28	AM410971	/	结球甘蓝 *B. oleracea* var. *capitata*	奥地利 Austria
D22	AM410972	/	油菜 *B. napus* ssp. *napobrassica*	丹麦 Denmark
G2	AM410973	/	甘蓝 *B. oleracea*	德国 Germany
G8	AM410974	/	甘蓝型油菜 *B. napus* ssp. *napus*	德国 Germany
G14	AM410975	/	白菜 *B. rapa* ssp. *oleifera*	德国 Germany
G26	AM410976	/	甘蓝型油菜 *B. napus* ssp. *napus*	德国 Germany
G27	AM410977	/	甘蓝型油菜 *B. napus* ssp. *napus*	德国 Germany
G29	AM931465	/	大白菜 *B. rapa* ssp. *pekinensis*	德国 Germany
G30	AM410978	/	大白菜 *B. rapa* ssp. *pekinensis*	德国 Germany
G31	AM410979	/	甘蓝型油菜 *B. napus* ssp. *napus*	德国 Germany

续表

病毒分离物	*HC-Pro* 基因登录号	*CP* 基因登录号	寄主	国家
G32	AM410980	/	甘蓝型油菜 *B. napus* ssp. *napus*	德国 Germany
G34	AM410981	AM931461	甘蓝型油菜 *B. napus* ssp. *napus*	德国 Germany
G35	AM410982	AM931462	甘蓝型油菜 *B. napus* ssp. *napus*	德国 Germany
G36	AM410983	AM931463	甘蓝型油菜 *B. napus* ssp. *napus*	德国 Germany
G37	AM410984	AM931464	甘蓝型油菜 *B. napus* ssp. *napus*	德国 Germany
H 1	AM410985	/	葱芥 *Alliaria petiolata*	匈牙利 Hungary
N23	AM410986	/	萝卜 *Raphanus sativus*	尼泊尔 Nepal
U17	AM410987	/	油菜 *B. napus* ssp. *rapifera*	英国 United Kingdom

为 864 个碱基（nt），编码 288 个氨基酸（aa）；*HC-Pro* 基因全长均为 1 374 个碱基（nt），编码 458 个氨基酸（aa）。采用 DNAStar 分析软件，将 21 个 TuMV 分离物的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因核苷酸及所编码的氨基酸序列进行同源性比较，*CP* 基因核苷酸同源性为 89.2% ~ 99.5%，编码的氨基酸同源性为 95.1% ~100%；*HC-Pro* 基因核苷酸同源性为 79.1% ~99.9%，编码的氨基酸同源性为 94.8% ~99.8%。来自浙江萝卜的 TuMV 分离物 ZJ1 的 *CP* 基因序列与另外的分离物同源性最低，核苷酸和氨基酸的同源性分别为 89.2% ~90.5% 和 95.1% ~96.5%。分别来源于江西和浙江萝卜的 TuMV 分离物 JX 和 ZJ1 的 *HC-Pro* 基因序列也表现出与另外分离物较远的亲缘关系，核苷酸和氨基酸的同源性分别只有 79.1% ~81.6% 和 94.8% ~96.7%。研究表明来源于萝卜属的 TuMV 分离物其 *CP* 和 *HC-Pro* 基因序列比来源于芸薹属的分离物变异大，*HC-Pro* 基因似乎比 *CP* 基因更易变异。

将 21 个 TuMV 国内分离物的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因序列与 GenBank 上登录来源于世界各地且有代表性的 18 个 TuMV 分离物进行核苷酸序列同源性比较，系统进化树表明：根据 *CP* 基因核苷酸序列的差异来分组，TuMV 国内分离物除 ZJ1 属 basal-BR 组外，别的都归属 world-B 组。而根据 *HC-Pro* 基因核苷酸序列的差异来

分组，分离物 JX 则属 Asian-BR 组，分离物 ZJ1 仍属 basal-BR 组，其余的都归属 world-B 组。已有的研究表明 TuMV 基因组易变异，基因重组在 TuMV 中广泛存在，遍布除 *6K1* 基因以外的基因组所有基因，因而可推断分离物 JX 基因组可能存在重组。根据报道，中国分离物 TuMV 分别属于 Asian-BR 和 world-B 组，而且来源于萝卜属的 TuMV 分离物大多属于 Asian-BR，来源于芸薹属的则多数归属于 world-B 组。我们的研究则发现 TuMV 中国分离物 ZJ1 属于 basal-BR 组的，这是第一次报道有关 TuMVbasal-BR 组的中国分离物，而日本 Tomitaka 等（2006）先前认为中国没有 basal-BR 组的 TuMV 分离物。

18 个 TuMV 国外分离物 *HC-Pro* 基因的核苷酸序列同源性为 79.5% ~99.8%，所编码的氨基酸同源性为 94.1% ~99.8%。其中 16 个分离物（A28、D22、G2、G8、G14、G26、G27、G29、G30、G31、G32、G34、G35、G36、G37 和 U17）的基因的核苷酸序列表现较高的同源性，同源性高达 92.1% ~99.8%，而另 2 个分离物（H1 和 N23）与这 16 个分离物之间的核苷酸序列同源性只有 79.5% ~86.6%，表现出较远的亲缘关系。分离物 H1 和 N23 之间的核苷酸序列同源性也不高，只有 81.8%，由此可见 *HC-Pro* 基因具有多样性，易变异。根据分离物的寄主和地理来源，对 *HC-Pro* 基因的核苷酸序列变异进行进一步比较分析。18 个 TuMV 欧亚分离物中只有分离物 H1 来自非十字花科的寄主，它与其余 17 个来源于十字花科的分离物表现出较远的亲缘关系，核苷酸序列同源性只有 81.8% ~86.6%。在 17 个来源于十字花科的分离物中，只有分离物 N23 的寄主是十字花科萝卜属，其余都是十字花科芸薹属。此外，N23 是 18 个 TuMV 分离物中唯一来自亚洲的分离物，它与其他 17 个 TuMV 分离物的 *HC-Pro* 基因核苷酸序列差异较大，同源性只有 79.5% ~81.8%。寄主亲缘关系和地理来源均相近的 TuMV 分离物的 *HC-Pro* 基因核苷酸序列则表现较高的同源性，如 18 个 TuMV 欧亚分离物有 13 个来自德国，寄主都是十字花科芸薹属，它们的 *HC-Pro* 基因核苷酸序列同源

性高达94.1%~99.8%。

将18个TuMV欧亚分离物的*HC-Pro*基因序列与GenBank上登录来源于亚洲（中国、日本和以色列）、大洋洲（新西兰）、欧洲（捷克斯洛伐克、德国、意大利和俄罗斯）、非洲（肯尼亚）和美洲（美国）国家，且是收集自不同寄主的有代表性的14个TuMV分离物进行核苷酸序列同源性比较，利用DNAMAN软件构建系统进化树。系统进化树表明：根据*HC-Pro*基因核苷酸序列的差异，32个TuMV分离物可划分为4个组，第一组含HRD、KD32J和N233个分离物，根据TuMV基因组全序列以及部分基因（如*P1*+*Ct*-*CI*+*6K2*+*VPg*+*NIa*-*Pro*+*CP*或*P1*+*CP*）的核苷酸序列对TuMV分子变异进行分组的研究中，HRD和KD32J都属于Asian-BR组，N23与它们同源性高达96.9%以上，表现出较近的亲缘关系。第二组含PV0104和KYD81J 2个分离物，已报道两者均属于basal-BR组。第三组含25个分离物，包括本研究的17个分离物（A28、D22、G2、G8、G14、G26、G27、G29、G30、G31、G32、G34、G35、G36、G37、H1和U17）和已报道属于world-B组的8个分离物。world-B组又可分成3个亚组：east Europe、New World和world-wide亚组。east Europe亚组包括分离物CZE1和RUS2；world-wide亚组包括本研究的分离物H1和其他4个分离物（DMJ、KEN1、KalJ和USA1），它们之间的同源性较高，均达92.2%以上；New World亚组包括本研究的16个分离物（A28、D22、G2、G8、G14、G26、G27、G29、G30、G31、G32、G34、G35、G36、G37和U17）和另外2个分离物（PV376-Br、NZ290），它们之间的同源性高达92.1%~99.8%，表现出较近的亲缘关系；第四组含St48和IS1 2个分离物，已报道它们属basal-B组。

本研究选择用于*HC-Pro*基因序列同源比较的这14个TuMV分离物，它们根据基因组全序列以及部分基因序列进行分组的结果均有报道，与我们依据*HC-Pro*基因进行分组的结果几乎一致，可见依据*HC-Pro*基因对TuMV分离物进行分组也是可行的。依据

HC-Pro 基因对本研究的 18 个 TuMV 国外分离物进行分组，来自亚洲的分离物 N23 属 Asian-BR 组，而其余 17 个来自欧洲的分离物都属于 world-B 组。根据已有的报道，欧洲的分离物主要属于 basal-BR、world-B 和 basal-B3 个组；亚洲日本的 TuMV 分离物归属 Asian-BR、basal-BR 和 world-B3 个组，而中国分离物分别属于 Asian-BR 和 world-B 组。

TuMV 具有 *Potyvirus* 成员少见的宽广寄主谱，是唯一可以侵染芸薹属的 *Potyvirus* 病毒。生物学和血清学研究表明 TuMV 存在广泛变异株系。Sanchez 等认为 TuMV 寄主范围广、变异类型多是其内在基因组易变异的反映。Ohshima 研究认为 TuMV 分子的起源进化可能是寄主适应和地理分布等综合因素作用的结果，研究结果也证实了 *CP* 和 *HC-Pro* 基因的变异与寄主和地理来源密切相关。寄主在 TuMV 进化中所起的作用是：寄主基因型的一些关键性差异影响病毒对寄主的适应，这种适应性的要求迫使病毒发生谱系分化。Ohshima 等（2002）认为世界各地 TuMV 的变异进化可能就像其芸薹属寄主一样，先起源于欧洲，然后传播到世界各地；BR 型致病型可能由 B 型致病型进化而来，并且 Asian-BR 组可能是在东亚出现新的进化类群，因为在 4 个 TuMV 分离物类群中，Asian-BR 组变异最少，地理分布区域最窄。TuMV 变异类型复杂可能与其广泛的地理分布和较宽的寄主范围有关。TuMV 分子的起源进化可能是寄主适应、地理分布、基因突变和基因重组等综合因素作用的结果。

四、寄主的抗性基因及其分子标记

在广泛筛选对 TuMV 抗性的寄主的研究基础上，人们又开始从分子生物学角度对抗性遗传机制进行深入探索。目前有关 TuMV 寄主抗性基因的研究在拟南芥和芸薹属作物上取得较大进展。Martin 等（1999）在拟南芥各生态型对 TuMV 的抗性研究中，发现有 4 种生态型表现出对 TuMV 的抗性，分别是 Bay-0、Di-0、Er-0 和 Or-0。其中 Di-0、Er-0 和 Or-0 具有基因型的抗性，在

TuMV 侵染过程中发挥不同程度的作用，而生态型 Bay-0 的好几个品种明显表现出对 TuMV 在胞间移动的干扰。拟南芥生态型 Ler 被 TuMV 侵染后的症状表现为叶脉坏死，该病症是由位于染色体 1 上的单个显性基因 TuNI 所调控。TuNI 被图谱定位在 MXF41 和 MRF28 两个标记之间的 105kb 片段上，在这区域内公认有 19 个基因，其中的 15 基因被划分为五大基因家族，基因家族 *Atlg*58480 和 *Atlg*58062 可能在病原侵染过程中起抗性作用。*Atlg*58480 基因家庭编码一种类似脂肪酶的蛋白，它可能与由水杨酸介导的防卫反应机制有关。基因家族 *Atlg*58602 编码 CNL（CC-NBS-LRR）蛋白，它已知是植物抗性蛋白的一种（Kaneko *et al.*，2004）。

许多抗性鉴定实验证实芸薹属中广泛存在对 TuMV 的抗性，目前所发现的 TuMV 抗性基因主要在甘蓝型和其他类型油菜上分离到，如 *TuRB01*、*TuRB02*、*TuRB03*、*TuRB04* 和 *TuRB05*，这 5 个抗性基因均已被图谱定位（Walsh *et al.*，1999；Hughes *et al.*，2002；Jenner *et al.*，2002）。另两个 TuMV 抗性基因 *TuRB01b* 和 *Tu* 分别来源于大白菜和莴苣（Robbins *et al.*，1994）。抗 TuMV 的抗性基因多数显性，可有效地抗 TuMV 特定的株系或致病型，最近发现大白菜中也存在广谱的隐性抗性。曹必好等（2002）在结球甘蓝高抗 TuMV 自交不亲合系 84075 品种上克隆到与 TuMV 抗性相关的基因 *TuR*。

第一个图谱定位的芸薹属抗性基因是 *TuRB01*，来源于春油菜 Westar 品系。这个定位在油菜 A 基因组的染色体 N6 上的显性基因，对 TuMV 致病型 1 所有分离物均表现高度抗性。欧洲 TuMV 致病型鉴定的鉴别品系 R4 来源于冬油菜品种 Ratal，具有单个显性抗性基因，能有效地抗 TuMV 致病型 1 分离物，可能这一基因就是 *TuRB01*。来源于大白菜品种 Tropical Delight 的抗性基因定位在染色体 R6 上，和 *TuRB01* 在 N6 上的位置相似，因而命名为 *TuRB01b*，它的抗性特性和作用机理是与 *TuRB01* 相同的（Walsh *et al.*，1999）。

另一个抗性基因 *TuRB03* 来源于甘蓝型油菜品系 22S，针对 TuMV 致病型 4 分离物 CDN1 有高度抗性。抗病和感病甘蓝型油菜杂交后代的回交实验表明，对 TuMV 分离物 CDN1 的抗性遗传是显性并单基因调控。用 AFLP（amplified fragment length polymorphism）和微卫星混合分离分析（Microsatelite bulk segregant analysis），对这种显性抗性进行分子标记，这个被命名为 *TuRB03* 的抗性基因，被图谱定位在甘蓝型油菜染色体 N6 上，与原先的抗性基因 *TuRB01* 在同一区域。*TuRB03* 不能有效地抗致病型 4 所有的分离物，它同样也只能抗致病型 3 的一些分离物而不是全部，这表明致病型 3 和 4 可再进一步细分（Hughes *et al.*，2003）。

此外，单个显性基因 *TuRB04* 和 *TuRB05* 已经在甘蓝型油菜品系 165 上发现并图谱定位。*TuRB04* 对有些 TuMV 分离物表现高度抗性，*TuRB05* 对有些 TuMV 分离物表现坏死反应（HR），限制其系统侵染。*TuRB04* 在 *TuRB05* 上位相连，两种基因都对 TuMV 致病型 1 和致病型分离物表现高度抗性（Jenner *et al.*，2002）。

上述几种抗性基因大都从甘蓝型油菜上分离到，目前来自 AA 染色体组的油菜对 TuMV 的广谱抗性也已被鉴定，它有效地抗在欧洲大陆普遍流行的 TuMV 致病型 1，这种特异性抗性几乎与甘蓝型油菜上发现的已被图谱定位的抗性基因 *TuRB01* 一模一样。一个对 *TuRB01* 抗性基因有抗性的致病型 1 突变体，也同样能抵抗来自 AA 染色体组油菜的抗性。这现象与柱状内含体基因的单碱基突变引起 TuMV 对 *TuRB01* 基因和 AA 染色体组油菜的抗性从无毒性到有毒性变化的事实，一并暗示，两种抗性可能由相同基因调控。在 AA 染色体组油菜上还发现另外两种对 TuMV 的抗性，一种是能抑制所有被检测的 TuMV 分离物系统侵染，另一种是几乎对大多数的 TuMV 分离物表现免疫。但是没有鉴定到对 TuMV 致病型 4 和致病型 12 的抗性资源。上述 3 种抗性在油菜后代显性遗传不分离，这表明调控这些显性抗性的基因可能是纯合的（Walsh *et al.*，2002）。

Hughes 等（2002）检测了 42 个甘蓝型和 AA 染色体组油菜

对 TuMV 三大欧洲致病型的抗性。这些油菜品系中，有 11 种对所有致病型都感病，有 9 种抗一种致病型，8 种抗两种致病型，14 种对三种致病型都有抗性。检测的品系中有 23 种可通过致病型 3 的 2 个分离物进行区别。Hughes 等提出了 4 种 AA 染色体组油菜对 TuMV 抗性遗传的基因模式：JongBai 2 号对致病型 1 具有由单个等位基因所调控的显性抗性；PI418957C 和 Jin G55 品系对致病型 4 隐性抗性，也是由单个等位基因调控；PI418957C 品系也同样具有对致病型 3 的隐性抗性，这种抗性是两个强性非连结基因位点中的一个来调控。JongBai 1 号也具有对致病型 3 的隐性抗性，但它是由 3 个基因位点上等位基因调控，其中任何 2 个基因位点都强性（上位）的，并且是抗性所必须的。目前有更多的致病型专化性抗性正在被鉴定，抗性基因也在被图谱定位。

芸薹属作物抗 TuMV 的分子标记研究随着抗性基因的发现逐渐深入。Hughes 等（2003）采用 CDN1 株系接种油菜后，用分离群体分组分析法（BSA）找到了 1 个与抗 TuMV 基因连锁的 AFLP 标记和 6 个 SSR 标记。闫瑾琦（2000）找到 2 个与大白菜抗 TuMV 基因紧密连锁的 RAPD 标记（OPV181400 和 OPV18820）。韩和平（2003）以大白菜抗病自交系 Brp0058 和感病自交系 B rp0181杂交后代的 F2 为材料，采用 BSA 法筛选到 2 个与 TuMV 感病基因紧密连锁的 AFLP 分子标记。王雪等（2005）根据 BSA 法筛选到与甘蓝抗 TuMV-C_4 株系基因连锁的 AFLP 分子标记。张俊华等（2006）以高抗芜菁花叶病毒 C_3 株系的高抗自交系 A156-2和感病自交系 P9805 杂交后代的 F2 代为群体，根据大白菜的抗性相关的表达序列标签（EST）设计引物，利用 BSA 法，筛选出 2 个与 TuMV-C_3 株系抗病基因紧密连锁的 EST - PCR - RFLP 分子标记 BS300 及 BS160。这些分子标记的研究为芸薹属作物分子育种、抗病基因克隆以及研究抗病基因特性等奠定基础。

第五章 雪菜病毒的传播

第一节 雪菜病毒的介体和非介体传播

研究一种植物病毒的传播方式对了解病毒病发生流行及设计防治措施非常重要。植物病毒是专性寄生物，它在寄主活体外存活期一般比较短，没有主动侵入无伤口组织的能力，在自然界生存发展必须在寄主间转移。雪菜病毒是活体专性寄生物，其生存和增殖依赖活的寄主细胞。雪菜病毒病的流行涉及到两个重要环节：①在同一发病寄主体内病毒由一个局部组织或器官扩散到其他部分组织和器官，这一过程称之为移动；②病毒从一个发病寄主转移到其他寄主上这一过程称之为传播。传播是病毒在植物群体中的转移，移动是病毒在植物个体中的位移。

雪菜病毒 TuMV 的传播与细菌和真菌等有很大区别。细菌有兼性腐生的能力，凭雨水或昆虫等传带到适宜的寄主上后，只要有适宜的环境，就能侵入而达到传播的目的。真菌除与细菌有同样的传播方式外还有专门的传播器官（孢子），可以借助各种自然的因素作远距离的传播。而 TuMV 一方面由于在寄主活体外的存活期一般比较短；另一方面又不能从寄主的气孔侵入，因此在传播上既不如细菌那样有利，也不如真菌那样主动而有效。雪菜病毒的有效传播，近距离主要是依靠活体接触而传播，远距离的就依靠寄主繁殖材料和传毒介体的传带。根据自然传播的方式来分，雪菜花叶病病毒 TuMV 的传播可以分为介体传播和非介体传播两大类。

一、介体传播

介体传播是指病毒依附在其他生物体上，借其他生物体的活

动而进行的传播。介体传播包括动物介体传播及植物介体传播两大类。其中动物介体主要有昆虫、螨类、线虫、真菌、菟丝子等，其中昆虫是最主要的动物传播介体。目前已知的昆虫介体有400多种，70%为同翅目的蚜虫、叶蝉和飞虱。其中约有200种属于蚜虫类，130多种属于叶蝉类（表5－1）。

表5－1　各类昆虫传播的植物病毒比例

昆虫种类	传播植物病毒病的百分比（%）
蚜虫类	43.5
叶蝉类	37.8
粉虱科	4.7
鞘翅目	3.5
长蝽象科	3.5
麦蜡蝉科	2.3
螽蟖科	2.3
缨翅目	1.2
介壳虫科	1.2

介体传毒过程可分为获毒饲育期、潜育期（循徊期）、接毒饲育期、持毒期4个时期：

（1）获毒饲育期：是指介体在病株上开始取食至获得传毒能力所需的时间；

（2）潜育期（循徊期）：是指介体从获得病毒到能传播病毒的时间；

（3）接毒饲育期：是指介体在健株上引起发病的取食时间；

（4）持毒期：是指介体能保持传毒能力的时间。

介体与所传病毒之间的关系可分为循徊型和非循徊型。病毒经口针、前消化道、后消化道，进入血液循环后到达唾液腺，再经口针传播的过程称为循徊。这种病毒与介体的关系称为循徊型关系；若病毒不在介体体内循环的则称为非循徊型关系。能在介体内增殖的病毒又称增殖型病毒。根据介体持毒时间的长短，介

体与所传病毒之间又可以分为非持久性、半持久性和持久性三种相互关系。

非持久性关系的特点是：病毒仅存在口器内，所需获毒和传播病毒时间都很短，只要几秒至数分钟，饲育时间延长反而降低传毒效率。病毒在虫体内没有循徊期，获毒后即可传毒。经短期饥饿后试食最易获毒，一次获毒后若连续刺吸植物，持毒一般不超过1h。若获毒后不刺吸植物也只能持毒几个小时，经过一次传毒后，大多不再持毒。非持久性传播病毒与介体之间的专化性较差。

持久性关系的特点是：获毒饲育期较长（10～60min），获毒后需经过一段时间后才能传毒，有明显的循徊期。传毒的可能性与获毒和传毒取食的时间成正比。介体获毒后传毒力可长期保持，甚至终身，也可经卵传播。这类病毒在介体内一般要经过病毒随着植物汁液到达肠部→渗入肠壁，进入血淋巴中→进入涎腺，经涎腺将病毒送出口针→进入植物组织内的循徊过程。

持久性病毒通常存在韧皮部及韧皮部附近的细胞，根据病毒能否在介体内繁殖，持久性病毒可分为增殖型和非增殖型两类。

半持久性关系的特点是：获毒时间需数分钟，获得的病毒在虫体内有循徊期，病毒进入消化道通过肠壁转入循环道到达唾液腺，要经过潜育一段时间才能传播，但不能在体内增殖。病毒可在虫体内保持1～3d。传毒的能力随获毒和传毒取食时间的增长而加强，饥饿处理不增加传毒效率。目前已发现15种病毒以这种方式传毒，在植物体内，半持久性病毒多数存在于韧皮部。

（一）昆虫介体

1. 蚜虫

从已知的植物病毒的种类来看，由蚜虫传播的病毒占极大多数。农业生产上至关重要的病毒病害，大部分是由蚜虫传播的。在蚜虫介体中，大约有250种蚜虫可传播13个科160多种植物病毒。有的蚜虫只传播2～3种病毒，有的可以传播40～50种病毒（如蚕豆蚜和马铃薯蚜），桃蚜甚至可以传播100种以上的病毒。

在这160多种植物病毒中，有的只由一种蚜虫传播，有的可由多种蚜虫传播，黄瓜花叶病毒甚至可以由75种蚜虫传播。蚜传病毒对植物寄主也没有什么限制，从单子叶植物至双子叶植物，都有由蚜虫传播的病毒病。

蚜虫（*Aphidinae*）之所以适于传播病毒，是因为它的口器在插入植物组织中时，不致造成较大的伤口。与其他半翅目昆虫比较，即使吸食较久，也不致使被吸食的细胞受伤。蚜虫常在表层细胞上进行试吸。这种试吸的习性使蚜传病毒的传布频率增加。蚜虫的口器还能插入到韧皮部从而使一些在韧皮细胞中增殖的病毒也得以传播。

根据蚜虫与病毒之间的生物学关系，250种蚜传病毒可分为非持久性、半持久性及持久性三类。大多数蚜传病毒属非持久性类型，包括马铃薯Y病毒属、花椰菜花叶病毒属、黄瓜花叶病毒属、苜蓿花叶病毒属等病毒。非持久性传播的病毒往往存在于植物的薄壁细胞，特别是表皮细胞、下表皮细胞和栅状组织细胞内，很少存在于韧皮组织内。一般都能用汁液摩擦方法进行传播，大多形成花叶病。延长蚜虫获毒时间会降低传播效率，带毒蚜虫在2~3株健株上取食后，就丧失传毒能力。半持久性传播的病毒种类不多，它们多数存在于植物韧皮部内，所以需要较长的获毒时间。蚜虫取食时间越长，则获毒率和传病率越高，接种部位也必需在韧皮部。持久性病毒通常存在韧皮部或接近韧皮部的细胞内，通常引起黄化和叶卷症状，一般不能经汁液传毒，仅少数能汁液传播，如莴苣坏死黄化病毒。通过研究表明，雪菜病毒TuMV主要通过蚜虫以非持久性方式传播，蚜虫是雪菜病毒传播的主要昆虫介体。

2. 叶蝉

叶蝉是仅次于蚜虫的植物病毒的重要介体，在叶蝉亚目大约2 000个属15 000种叶蝉中，只有21个属中的49种是病毒的传播介体。叶蝉传播的病毒寄主主要是禾本科植物，通常引起黄化、叶卷等症状，病毒主要存在于韧皮部，一般不能通过汁液传

染。叶蝉绝大多数只能传染一种病毒，有少数能传染 2～4 种病毒，也有少数病毒能由 2～4 种叶蝉传染。如水稻矮缩病毒（RDV）能由黑尾叶蝉、二点黑尾叶蝉和电光叶蝉传染。叶蝉传染的半持久性病毒有水稻东格鲁病毒（RTV）和玉米褪绿矮缩病毒（MCDV）两种。叶蝉传染的非增殖型的持久性病毒如虎尾草条纹花叶病毒（CSMV）。叶蝉传染的绝大多数植物病毒为增殖型的持久性病毒，病毒在介体内的潜育期一般为 1 周以上，如水稻矮缩病毒。

3. 飞虱

飞虱虽然有 20 个科，但仅飞虱亚目中的一部分能传播植物病毒。已知有 22 种飞虱传染 23 种植物病毒。如水稻黑条矮缩病毒（RBSDV）、水稻条纹叶枯病毒（RSV）、玉米粗缩病毒（MRDV）等。飞虱传染的病毒全部是循徊型病毒，且大多是增殖型的，病毒还能通过飞虱的卵传染给后代，RSV 已被证明可经卵传染 40 代。此外粉虱、粉蚧、蓟马和甲虫也是植物病毒的传播介体。

（二）螨类

螨类分为两种：瘿螨和蛛螨。瘿螨传染的病毒研究较多的是由曲叶螨传染的小麦条纹花叶病毒（WMSV），病毒传毒类型属非增殖型持久性传播。

（三）线虫

线虫可传播许多重要的植物病毒病，这些线虫主要属于矛线目中的长针科和毛刺线虫科。已经知道 5 个属 38 种线虫可传播 80 种植物病毒或其不同的株系，其中多数属于蠕传病毒属和烟草脆裂病毒属的病毒，少数为其他球状病毒。病毒在线虫体内没有潜育期，病毒不能在介体内复制。由于线虫在土壤中移动很慢，传播距离有限，每年仅 30～50cm。因此，这些病毒的远距离传播主要依靠苗木，大多数还可以通过野生杂草的带毒种子传播。

（四）真菌

土壤真菌有 3 个属能传播 16 种植物病毒，3 个属分别为：粘菌门根肿菌纲中的多粘菌属、粉痂菌属、真菌门壶菌纲油壶菌属。其中油壶菌属传染球形病毒，多粘菌属及粉痂菌属传杆状及线状病毒。

二、非介体传播

非介体传播包括机械方式、种子、花粉、无性繁殖、嫁接和菟丝子传播。

（一）机械传播

机械传播也称为汁液摩擦传播，指的是病毒通过植物表面的伤口进入植物的过程。包括田间的接触或摩擦接种。机械传播对某些病毒很重要，如烟草花叶病毒属和马铃薯 X 病毒属只有此种传播方式。雪菜花叶病病毒 TuMV 就可以通过田间植株间接触、农事操作、农机具及修剪工具污染、人和动物活动等侵染植物，同时也可通过室内的汁液摩擦接种传播。

（二）种子和花粉传播

现在普遍认为只有病毒进入胚且进入胚后能存活，才能发生种传。病毒种传的主要特点是母株早期受侵染，病毒才能侵染花器。种传病毒的寄主以豆科、葫芦科、菊科植物为多，而茄科植物却很少。种子带毒的危害主要表现在早期侵染和远距离传播。早期侵染在田间形成发病中心，为蚜虫等介体传毒提供初侵染源，因而两者结合极易造成严重病害。带毒种子随调运进行远距离传播，可在种子中长期存活的病毒是检疫的重要对象。据研究，雪菜病毒 TuMV 不能通过种子方式传毒。目前已知由花粉直接传播的病毒数量有十几种，多数寄主是木本，如桃环斑病毒和樱桃卷叶病毒。不少种子传染的病毒是可以通过花粉传毒的，凡是能花粉传毒的，种子一定能带毒。

（三）无性繁殖和嫁接传播

无性繁殖材料包括块茎、球茎、鳞茎、块根、蔓根、插条、接穗等。利用无性繁殖材料繁殖，往往造成病毒的传播。如马铃薯、大蒜、郁金香、苹果树等，如母株受侵染则传染后代，这些带毒的无性繁殖材料是重要的检疫对象。在植物体内除生长点外各部位均带毒，因而利用茎尖分生组织培养可以培育无毒苗。

嫁接是园艺上古老的栽培措施之一。嫁接可以传播任何种类的病毒、植物支原体和类病毒病害。嫁接时病毒能从带毒的接材或砧木进入植株而产生系统病害。一般草本植物嫁接后很快出现症状，木本植物则要经过休眠期后才出现症状。有时嫁接会改变病毒病症，如烟草花叶病毒通过嫁接可在寄主上产生系统坏死症状，而通过摩擦接种只产生局部枯斑。

（四）菟丝子

菟丝子是旋花科菟丝子属植物的总称，攀缘寄生于高等植物，没有根和叶。菟丝子传播病毒，实际上相当于一种自然嫁接作用，病毒在菟丝子内可以不繁殖，而起到管道作用。

第二节 雪菜病毒的侵染途径

雪菜病毒的侵染与昆虫及动物病毒的侵入有所不同，与细菌病毒（噬菌体）的侵入亦不一样，雪菜病毒只能通过细胞的微伤处侵入。雪菜病毒的侵染要具备以下几个必要条件。

一、需要具有“侵入的门户”——伤口

病毒 TuMV 侵入雪菜的部位主要是叶片。整个雪菜叶片的横切面可以分为上表皮、栅栏组织、海绵组织和下表皮，在上表皮上有丛毛细胞和气孔，而在下表皮却只有气孔；细胞壁内的原生质约厚 10μm，液胞占细胞全部体积的 80%～90%。细胞壁上有

沟通原生质的极为细小的通道，称作胞间连丝。病毒是通过胞间连丝在雪菜植株细胞内移动，造成系统侵染。

1930～1932 年 Caldwell 曾做了这样一个实验：将番茄叶片的叶柄切伤处迅速地浸入烟草花叶病毒的汁液中，结果叶片获得侵染；但是叶柄切伤后经 24h 再浸入病毒汁液中就不能受侵。这个现象说明切伤后病毒可以通过微伤细胞侵入，但 24h 以后，细胞受伤处已经愈合，不能被病毒所侵入，同时也说明，导管虽照常吸收病毒，但不能诱致侵染，如果在叶脉处挤伤，也能受侵染。周书军在雪菜上也做过类似的试验，他将雪菜的幼苗用培养液培养，并将病毒放入培养液中，通过加入石英砂使根部在接触时擦伤，病毒也能通过根部伤口而获得入侵。上述试验，说明病毒必须通过微伤口才能进入雪菜细胞。

二、需要通过“侵入的门户”进入繁衍点——原生质内

一个简单的试验可以证明这一点：在细胞的外面滴上 1 滴 10% 的糖液，然后接种，这样往往不能导致侵染。原因是糖液的渗透压使原生质收缩（质壁分离），因此病毒无法进入原生质内，从而不能导致侵染。但是用同法处理后，以昆虫来接种，依然可以受到侵染，原因是某些昆虫的口针可以将病毒送入原生质内，或与原生质相沟通的胞间连丝内，这样就不受原生质收缩的影响。这些事实都证明病毒必须要进入细胞的原生质内后才能开始繁殖而侵染，如果病毒直接进入细胞中的液泡内，那么也不可能导致侵染。

三、要有一定量的病毒粒子——建立侵染限点

雪菜病毒的侵入和其他类型的病原物一样，具有一个侵染限点，而建立一个侵染点至少要一定数量的病毒个体。这种侵染限点因病毒的种类而不同。据试验，有的只需要病毒粒子就能建立一个侵染点（坏死斑），而有的病毒则需要几千个病毒的粒子。

虽然目前对于雪菜病毒的侵染机制还不很了解，但基本可以肯定病毒侵染雪菜需经过一个短暂潜隐期后，新的病毒粒子便大量出现，侵染点就随之建立。

第三节　影响雪菜病毒侵染的因素

雪菜病毒侵染受到各种因素的制约，特别是各种环境因素。首先病毒侵染影响寄主的代谢作用，使它在生理上起一定的改变，这种改变可能有利于病毒的侵染，增加寄主的感病性，但也有些改变不利于病毒的侵染，反而增加了寄主的抗病性。因此了解影响病毒侵入的因素，对人们设计改变寄主的环境条件，从而控制植物病毒在农业生产中的为害有重要意义。

影响病毒侵染的因素主要有：

一、病毒本身的影响

有的病毒容易通过擦伤侵入，有的病毒则难以通过擦伤侵入。一般地说，凡是易于用电子显微镜观察的植物病毒，例如芜菁花叶病毒、南瓜花叶病毒（SqMV）、莴苣花叶病毒（LMV）等都易于用摩擦接种，容易通过擦伤侵入；而有一些病毒，则不易于用电子显微镜观察，难以通过擦伤侵入。

病毒在活体外的存活期因病毒的种类不同而有很大的不同，有些病毒的存活期很长，这些病毒都易于用摩擦接种。相反，有些存活期短的病毒，例如番茄斑萎病毒（TSWV）就比较难于用擦伤传播。

病毒也可以从传播的昆虫种类来看出它是否容易通过摩擦传播。一般来说，凡是由叶蝉类传播的比由蚜虫传播的病毒更难于用摩擦接种。据统计分析，50 种由蚜虫传播的病毒中，至少有 25 种可以用摩擦接种，易于摩擦传播，雪菜病毒 TuMV 就是其中的一种。

草木植物的病毒常比木本植物的病毒易于用摩擦传播。例如

桃树上的病毒易于传播到雪菜上，而雪菜上的病毒则不易传播到桃树上。

从病毒寄主的症状类型来看，花叶症类型的病毒常比黄化症、卷叶症或粗皮症等类型易于通过摩擦接种传播。

二、寄主的影响

决定侵染的因素中，寄主是主要的一环。寄主的影响可以分为两方面。一方面是将病毒授予的寄主，把它称做授主；另一方面是接受病毒的寄主，把它称作受主。同一种病毒，来自不同的授主，可以影响到它侵入的能力。例如来自十字花科作物的病毒容易侵入雪菜，但是来自非十字花科蔬菜的病毒就不易成功。

授主的作用大部分还没有明了，但是很明显的是有些授主的压出液对病毒在体外有抑制作用，例如菠菜压出液对黄瓜花叶病毒有抑制作用。相反，也有一些授主的压出液对病毒的侵入有促进作用，例如将苹果的健叶汁加在苹果花叶病叶压出液中，可以增加侵入率。

受主在不同的环境条件下，受侵的情况不一样，一个受主在被其他寄生物寄生后，也往往影响到它对病毒侵入的抗性，例如雪菜感染根肿病后，会促进了花叶病毒在细胞内的活动，加剧病情。

雪菜病毒侵入，多数情况下是靠雪菜叶子表层的柔膜组织细胞的擦伤侵入雪菜组织的。病毒进入这些细胞以后获得了繁殖的必要物质，并由此建立侵染点。但是，同一个叶片上的各个细胞之间的感受能力是不一样的，有些细胞的感受能力强，很容易接受病毒而建立侵染点；有些细胞的感受能力弱，病毒不易在这些细胞里建立侵受点。因此即使同一叶片上所有细胞都受到微伤，同样都受到病毒的接触，可是其中只有一部分能被侵入，而另一部分则没有被侵入的反应。

根据上述的一些现象，一般认为在细胞的擦伤处必须要有一种能接受病毒的物质，然后才能让病毒建立侵染。这种物质称作感受点。寄主的对象（品种）不同，感受点物质也不一样，有的

易感病，有的则不易感病。

至于抗病反应乃是指病毒在植物寄主上可以侵入而建立侵染点，但由于寄主细胞被激活产生了一种抵抗机制，使病毒在一个点上不能进一步发展，或即使发展了，也极为微弱，这种寄主可称为是抗病的。任何一种植物能被病毒侵入而建立侵染点，说明它和病毒在一定条件下有亲和性（Affinity），易感病。感病性与抗病性是一个现象的两面：抗病性愈大，感病性就愈小，相反亦然。因此一个寄主的抗病程度是该寄主抗病面与感病面的统一。这两个对立面是可以互相转化的，在外因通过内因起作用的条件下，农作物可以通过栽培管理来增加抗病性。

寄主的抗病现象往往表现在下述的几种反应中：

1. 复原反应

病毒侵入后建立了浸染点，出现褪绿等症状，但是这种侵染点不能扩展成为系统侵染，很快就恢复原状。这一类现象也被解释为病毒受到韧皮部的一种钝化物质而被钝化了，而在侵染点的柔膜细胞中却没有这种钝化物质。

2. 过敏性反应

这种反应的主要表现为坏死。细胞受到病毒的侵染后由于过度的敏感，细胞死亡。病毒是不能在死亡的细胞中发展的，因此病毒无从扩展为系统性浸染。如前面已经提到过的，有时细胞虽然有坏死反应，由于病毒的扩展速度大于细胞的死亡速度，这样病毒依然能够突破坏死的范围而发展成为系统侵染。过敏性反应在实践中有重要的意义，例如要确知一种植物的砧木和块茎中是否带有某种病毒时，利用具有过敏性反应的接种（常产生顶尖坏死反应）来测定时，往往可以得出正确的结论。另一种过敏性反应，称做自我截肢反应。病毒侵染后、起初是局部性的，但不久被侵染的叶柄处产生离层，使叶片很快脱落，从而使侵入的病毒也随之而脱去。这种情况显然证明，病毒侵入后能产生一种毒素，毒素先病毒而达到叶柄处，使叶柄产生离层。例如辣椒被TMV 的一个株系侵染后就有这种反应。过敏性反应还表现为休克

复原现象，例如番茄斑萎病毒接种在心叶烟上，先出现茎部的严重坏死，然后产生新叶，只有极轻的斑驳症了。另外如 PXV 和 PYV 混合接种烟草，也有类似的休克复原现象。

3. 隐潜（Masking）

这是指寄主植物在一定的条件下暂时失去症状，例如烟草感受 TMV 后处于 37℃ 下较久，就会失去症状。在自然情况下可以看到许多种病毒病害都有暂时失去症状的反应能力。有一类寄主得病后不能表现症状或只能表现极为轻微的症状，前者称之为带毒体（carrier），后者认为具有耐病力（Tolerance）。耐病力在病毒学中是极为重要的，因为具有耐病力的寄主不一定有什么生产上的损失，而且选择耐病品种在生产上比选抗病品种较为容易。

三、接种（受侵）部位的影响

植物体的各个器官和各个部位对接种（受侵）的反应是不一样的，接种（受侵）时使用叶片的正面或反面，可以得出不同的结果，一般以正面接种（受侵）高于负面，但也有相反的情况。有的在茎上接种（受侵），感受力要大于叶片。一般来说，根部往往不利于病毒的侵入，但有些土壤传播的病毒就易于从根部侵入。

四、温度的影响

温度对寄主细胞的生活活动力的影响最为显著。温度的改变往往影响到寄主细胞的感病力。试验证明，在人工接种前将寄主作高温处理后，往往可以增进寄主的感病性。温度的改变可以使一个抗病品种变为一个感病的品种的事例很多。

另外有一些病毒病害，随着温度的升高，到一定水平以后表现抗病力的递减，体内的病毒亦随着温度的升高而递减。不但气温对病毒侵染力有显著影响，土壤温度的关系亦很大。譬如雪菜种在人工控制土温的土壤内，可以看到土温越高，雪菜的感病性愈大。

温度在一种病毒病害侵染过程中，首先影响的是侵入，其次即为潜育期的改变。温度影响潜育期的关系不完全在于对病毒繁殖速度的作用，同时也与病毒转移的速度有密切的关系，例如病毒从表皮细胞转移到下层细胞的速度与温度有关。

五、光的影响

光是雪菜进行光合作用的主要能源，它不但影响雪菜的新陈代谢作用，并且也影响到病毒的侵入。一般在接种（侵入）前做黑暗处理可以增进侵入，接种（侵入）后延长光照也有同样的作用。原因是在光照之下有些抑制病毒侵入的物质，例如碘代乙酸盐被光照破坏了，而在黑暗中这类物质有所增加。

光照对于侵入的影响不仅表现在人为的遮光处理等方面，即使在同一天内不间的时间接种（侵入），效果也不相同，一般以上午 11 时至下午 5 时之间的最容易感病。

在植物病毒病害症状的发展过程中，许多试验都证明了光照的强度及时间都能影响症状的表现，同时也影响病毒繁殖的速度。首先，光照时间的长短会影响植株内病毒繁殖的速度。这个速度是可以用病毒的浓度来代表。芜菁花叶病毒的一个株系就有这个现象。接种后分别将每天的光照时间调节为 4h、8h、12h、16h，经 7d、14d、21d 及 28d 后测定植株中所含病毒的浓度。结果表明，光照的时间愈长，所含病毒的浓度愈高，同时也表示，病毒的浓度是随寄主生长速度的增加而提高的。

同一种病毒病害放置在自然光照和人工光照的条件下，症状往往会表现很大差别，如 CMV 在辣椒上，自然光照下出现的症状为白色斑、网纹、叶片畸形、节间缩短等，同时发病率也较高，但在人工光照下，一般只出现花叶，没有叶片畸形及矮化现象，发病率也较低。

关于接种（侵入）后遮阴所起的影响，一般可以分为两方面：一方面是由于遮断强光而使症状减弱或成隐潜，这一类病毒的表现与植物的正常生长有正相关性，也就是说，光合作用的减

退会影响到症状的减弱；另一方面，有些病毒在遮阴的情况下，往往加重了症状，这一类的病毒与表现同细胞的理化特性有关，因为它们表现的主要症状为细胞和组织的坏死。

季节性的影响不仅仅是光照的问题，同时还有温度等其他因素的作用。在病毒病害中，我们可以按照其季节性，把它们区分成2个类型：第一个类型是夏季比较严重而冬季比较轻的病毒病害。这一类型中主要包括黄化型病毒。夏季的高温、强光、长日照有利于作物的生长发育，从而也有利于这一类病毒的繁殖和表现。第二个类型与上述相反，是冬季症状重而夏季症状轻。所有花叶症病毒大都属于这一类。一切花叶病的接种（侵入）在秋冬及早春季节进行容易表现典型的症状，而在炎热的夏季，往往不典型或不明显。

六、营养关系

一般地说，含氮量增高则寄主中的病毒含量亦相应增加。缺氮的情况下，病毒蛋白质及寄主蛋白质都没有显著的改变，但病毒侵染力却明显减退。其原因是：在寄主细胞缺氮的情况下，病毒并不能利用寄主细胞的正常蛋白质，使其转化为病毒的蛋白质，据此可以认为增加氮则增加感病性。研究表明磷素增加也能增加植物的感病性，但是增加到超过了有利于植物生长的水平时，就不起这种作用。钾的作用似乎与上述两种要素相反，在有利于植物生长的范围内能降低植物对病毒的感病性。总的来说，最有利于寄主生长的氮、磷、钾水平，也最有利于病毒的繁殖。

七、生理年龄的关系

不同生理年龄的植株、器官或组织对同一病毒的反应来说也是不一样的。一般来说，幼小而生长旺盛的植株、器官或组织容易受侵，这种感病性随着生理年龄的衰老而逐渐减退。有些病毒（如雪菜病毒病）在幼小的叶片上容易引致系统性的花叶症状，但在老叶上只能产生一些枯斑。

八、摩擦材料的影响

摩擦材料是摩擦接种的重要工具，用得比较多的是金刚砂（碳化矽），其使用效果一般要优于石英砂，使用的筛目一般在400号至600号之间。但筛目大小的关系不是唯一的，同时也必须考虑到分布面是否均匀。譬如使用同一筛目的金刚砂而采用不同的撒布方法那么结果是撒布得愈均匀，效果越大。

在大规模进行田间擦伤接种时也可采用高压力的喷雾方式，一般是把摩擦材料与接种物混和后，通过高压力的喷雾方式喷射到被接种的植物上，例如在100mL接种液中加入3g 240目的石英砂喷雾，能收到较好的接种效果。

九、化学物质的影响

在擦伤接种时，如果在接种物质内加入一定的化学物质往往可以增加接种的效果。例如将1.7%的磷酸氢二氢钾加到雪菜花叶病毒汁液中去后，可提高接种效果。此外，在晚上接种的其效果不如在早上大，使用稀释度大的液汁的其效果不如小的好，接种后冲洗太快的效果亦不好。若在接种物中不加入磷酸缓冲液，而在摩擦后立刻用磷酸缓冲液冲洗，也能显著提高侵染率。

十、水的影响

在摩擦接种后，用清水冲洗接种物，这样可以增加侵染率。各种不同的病毒有其自己的最适稀释度和稀薄限点，有时用不稀释的压出液，往往不能获得侵染，这是因为高浓度的压出液中含有寄主细胞的抑制物质。通过稀释可以克服这种抑制物质的作用。超过稀释限点时，也就是每单位面积（叶面）上遭遇到的病毒粒子数量，已低于侵染限点，因此不能建立侵染。

第四节　雪菜受病毒侵染后的变化

一、雪菜生理机能变化

病毒一旦侵入雪菜体内，建立了侵染关系，雪菜生理机能会出现以下一些变化。

1. 呼吸作用变化

呼吸作用指的是氧的吸收及二氧化碳的释放。测定呼吸作用，往往采用2个标准：一个是氧的放出量（单位面积鲜重或干物量），另一个是二氧化碳的吸收量（单位面积鲜重或干物量）。CO_2/O_2 的比数一般称为“同化商”。呼吸作用的强度有时以氧的吸收量为标准，有时也用二氧化碳的放出量为标准，也有人用“同化商”来估计。

根据已有资料来看，病毒侵入后雪菜的呼吸作用的改变情况是不一致的。在不同的雪菜上用不同的病毒来接种，往往获得不同的结果。有些场合，病毒侵入雪菜1h后，呼吸强度增加，几天以内还继续增高而达到一个高峰，以后又逐渐减迟而达到正常水平之下。有些病毒侵入后，呼吸作用的增强并不立刻表现出来，要等到症状出现时才显著。有人在雪菜上的一个试验表明，呼吸作用在侵染后的头几天是增加的，以后暂时出现一次下降，以后又进一步的下降。在幼叶中，呼吸作用的强度比在老叶中高，相应地病毒的浓度也较高。在生长期终了时，所有受侵叶片的呼吸作用都比健株的叶片弱。有些病毒在侵染后使寄主植物的呼吸作用长期亢进，甚至在症状已经隐潜以后，还继续亢进。也有一些病毒侵入寄主组织后，寄主组织的呼吸作用显然比健株减退。总之，一般在侵染后寄主呼吸作用都有所改变，但是究竟是增是减还没有一定的规律可寻。

2. 光合作用变化

光合作用是植物代谢机能中最基本的一个环节。光合作用的

强度可以通过二氧化碳的吸收量或碳水化合物的积累量或氧的放出量等来加以测定。由于氧的释出往往可以被其他同化作用所利用，因此在病毒侵入后，光合作用往往减退。

3. 氮素物质及蛋白质的代谢发生变化

病毒本身的增殖就包括蛋白质的合成过程，因此病毒的侵染影响了寄主细胞的蛋白质合成，常常表现为各种氮化物量的变化。雪菜感染了 TuMV 病毒后，植株内的 NH_3 态氮就增加，而 NH_2 一般不增加或减少。

4. 酶的变动

酶是细胞代谢活动的基础，病毒进入寄主细胞后，往往打乱寄主正常代谢中酶的活动，如病毒侵染的植株中，糖化酶的活力一般提高了 2 ~5 倍。转化酶、氧化酶、磷酸酶、多苯酚氧化酶也有此现象，但因不同的病毒类型而异。

5. 细胞中其他物质的变化

病毒侵染寄主也影响细胞中其他物质的变化，如在温室中栽培的雪菜接种 TuMV 6d 后，组织内的无机磷及总磷量都降低了。接种的第二天，幼叶中的磷脂开始增加，以后也递减到一般的水平以下。另外一些病毒的侵染也引起磷及磷酸的增加，不过灰分、钙、硫酸和草酸有所降低。

雪菜在感染病毒后，组织内的生长素或激素也有所改变。雪菜感染 TuMV 后，植株内的吲哚乙酸有降低的倾向，但是也有相反的现象。植物感染病毒后出现的矮化或徒长或畸形包括丛枝等症状，都和组织内生长素或激素的增减有一定的关系。

有些病毒侵入寄主后能在寄主细胞内诱发毒素，有时也产生一种具有些萤光性的物质，例如莨菪素（$C_{10}H_8O_4$），这种物质在紫外线下，可以看到它的萤光性。一般像产生坏死斑以及蚀纹等症状的病部容易看到这种物质。除此以外，生物碱的含量也有改变。

二、雪菜病毒入侵后形态特征的变化

病毒侵入寄主细胞后常引起寄主形态特征上发生变化。雪菜

在形态上的病变主要表现在植物生长受到抑制；器官之间发育比例反常；叶、萼、花变色变形。具体征状表现为两大类型：

1. 重缩叶型

多在新抽出的嫩叶上开始发病，老叶一般不表现症状。最初沿叶脉退绿表现明脉，多由叶基部向上扩展至全叶，稍后呈现深绿和浅绿相间的花叶状，随后叶片表现严重皱缩，叶脉间的叶组织向上凸起，显现小而密的凹凸不平现象，叶片向一边扭曲或卷缩而畸形，叶片背面主脉或支脉上发生褐色坏死条纹，其上横行裂口，生褐色坏死小点。此种条纹与龟裂可沿叶脉扩展，病势加重时，能使叶脉开裂，生长受阻，病重的植株严重萎缩，组织变脆，易折断，下部病叶较早变黄死亡。

本病在种株上除表现上述症状外，花梗短缩呈帚状，或部分花梗短缩，长短不一，有时在花梗上有褐色横裂口，种子不饱满。

2. 花叶型

多在嫩叶上发病，初期表现明脉，有时褪色部扩展成带状，稍后即表现成明显的花叶病状，或叶片呈淡绿色，其上有深绿色之凸起和下凹的斑块，也表现为轻微皱缩，植株生长缓慢。病重的植株严重矮缩，病叶逐渐黄化死亡。

第六章 选育并推广抗(耐)病品种

第一节 品种对病毒的抗性

研究雪菜病毒的最终目的，在于掌握病毒病的发生发展规律，从而使人们能有效地控制这种病害，保护雪菜的正常生长发育，以获得稳定的丰产。

生产实践证明，雪菜的不同类型、同一类型中的不同品种对病毒的感染具有多样性，按寄主对病毒的抗性类型来分，可以分为免疫、抗病、耐病及感病几种。

所谓抗病性，是指品种抵抗病毒侵染的能力。抗病品种是指病毒不能侵入、或侵染后病毒没增殖、病毒复制量极少，不产生严重症状甚至只能局限在少数组织之内的品种；而耐病品种指病毒在它们的体内繁殖，但只能表现比较轻微的症状，或表现较重的症状而损失较少的品种。

雪菜品种的抗性一般都由一定的基因组所调控，在杂交过程中能按一定的规律遗传给后代，但有的抗性基因常与不良农艺性状相互关联。目前，生产上大面积种植的雪菜品种产量高，但抗性普遍较差；而一些地方品种虽然抗病性较好，但农艺性状较差。因此在雪菜抗病育种中，要把抗病的与农艺性状好的品种进行杂交组合，选育出可以在生产上广泛使用的优质高产抗病品种。

这里所说的抗病品种，其含义包括多方面的内容，有些品种“抗病”，实际上并不是对病毒的抵抗，而是对昆虫介体的抵抗，这些品种的体外都有一个昆虫不喜欢的保护层。实际上抗虫品种也发挥了抗病品种的作用。宁波市鄞州区绿原雪菜开发研究中心搜集的雪菜地方品种中有一些带有红色紫边的品种，如鄞雪47号等，这些品种病毒病的发病率都较小，很可能是由于这种色素

比起绿色来不易受蚜虫的注意，从而达到保护它自己免受病毒侵染的效果。有的品种对病毒具有过敏性反应，病毒一旦侵入，被侵入的细胞很快死亡，在外表显示了坏死斑。病毒在这种坏死细胞内，不再有扩展的活动能力，从而被局限在枯斑内。这种过敏性反应的结果，使植株免于成为系统侵染。

施曼玲于 2004 年，利用宁波市鄞州区绿原雪菜开发研究中心收集的 57 个雪菜地方品种，进行温室和大田人工接种，利用 TAS – ELISA 方法对接种雪菜中的 TuMV 浓度进行了测定。在 TuMV 接种后 10d、15d、20d 和 30d，57 个雪菜品种中 TuMV 阳性检出率分别为 46.55%、91.38%、100% 和 100%，大多数雪菜 TAS – ELISA oD_{405} 值随接种后天数的增加而呈上升趋势。检测结果表明，57 个品种中，抗 TuMV 的雪菜品种有 7 个（8、11、13 – 1、16 – 2、20、33 和 45 – 1），耐病品种 22 个（板叶型 8 个，细叶型 11 个），感病品种 28 个，未发现高抗品种。总的来说，细叶型品种比花叶型和板叶型抗病。

施曼玲等对雪菜品种抗病性采用了以下方法进行了测定：

一、病情调查

供试雪菜共 66 个品种，来自河南、湖北、湖南、江西、江苏、浙江、四川、安徽和上海等省市以及香港特别行政区，分别命名为 1-66 号。所有雪菜品种由宁波鄞州区绿原雪菜开发研究中心提供。

温室接种后第 20d 和大田接种后第 25d 的病株数及病株率见表 6 – 1，接种后温室和大田雪菜的病情指数与抗病类型见表 6 – 2。检测结果表明，实验室 4 次接种试验的病株数和发病率均以细叶型最低，花叶型次之，板叶型相对较高。温室和大田结果基本相符。

二、TAS – ELISA 检测

大田两次接种试验及温室第一次接种试验，所有雪菜苗均

于接种后第 25d 进行 TAS－ELISA 检测，获得各品种新嫩叶的 oD_{405}值（表 6－3）。温室第二次接种试验，分别在雪菜接种后第 10d、15d、20d 和 30d 进行 TAS－ELISA 检测，各品种的 oD_{405}值见 表 6－4。雪菜接种后第 10d TAS－ELISA 检测，58 个品种中有 27 个呈阳性反应，占 46.55%；第 15d 检测，则有 53 个品种呈阳性反应，占 91.38%；而到了第 20d 和 30d，58 个品种都 100% 呈阳性反应。从表 6－4 也可看出：大多数雪菜 oD_{405}值随着接种后天数的增加而呈上升趋势，这表明雪菜病株中的病毒含量可能在逐渐积累。把雪菜各品种接种后第 20d 和 25d 的发病率及病情指数与各品种 oD_{405}值结合起来分析比较，发现品种发病率及病情指数高低与各品种 oD_{405}值大小之间不存在相关关系，尤其到了接种后第 30d 抗病品种和感病品种病株中的 oD_{405}值几乎无明显差异，但是抗病品种在接种后早期比别的品种明显地表现出很强的抗病性，在接种后第 10d 和 15d oD_{405}值普遍比感病品种低。由此可见雪菜抗病品种的抗性表现是推迟发病或不发病。

表 6－1　温室和大田雪菜接种 TuMV 后的发病率

品种及叶子形状		病株率			
		温室接种后第 20d 20dpi *		大田接种后第 25d 25dpi	
		第一次试验	第二次试验	第一次试验	第二次试验
1－3	板叶	100%（12/12）	70%（7/10）	100%（10/10）	/
2	细叶	—	50%（5/10）	—	/
3	板叶	100%（12/12）	100%（8/8）	—	/
4－1	花叶	60%（6/10）	80%（8/10）	100%（10/10）	50%（5/10）
5	细叶	8.33%（1/12）	90%（9/10）	100%（10/10）	0%（0/10）
6	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	—	/
7－1	板叶	58.33%（7/12）	80%（8/10）	100%（10/10）	60%（6/10）
8	细叶	8.33%（1/12）	10%（1/10）	20%（2/10）	0%（0/10）

续表

品种及叶子形状		病株率			
		温室接种后第 20d 20dpi *		大田接种后第 25d 25dpi	
		第一次试验	第二次试验	第一次试验	第二次试验
9－8	花叶	16.67%（2/12）	50%（5/10）	30%（3/10）	0%（0/10）
10	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	50%（5/10）
11	细叶	8.33%（1/12）	10%（1/10）	10%（1/10）	0%（0/10）
12	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	80%（8/10）
13－1	细叶	8.33%（1/12）	20%（2/10）	30%（3/10）	0%（0/10）
14	板叶	—	100%（10/10）	—	/
15	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
16－2	细叶	8.33%（1/12）	10%（1/10）	10%（1/10）	0%（0/10）
17	板叶	100%（12/12）	100%（7/7）	100%（10/10）	70%（7/10）
18－5	板叶	66.67%（8/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	100%（10/10）
19	板叶	66.67%（8/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
20	细叶	16.67%（2/12）	60%（6/10）	30%（3/10）	70%（7/10）
21－1	细叶	41.67%（5/12）	50%（5/10）	60%（6/10）	30%（3/10）
22	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	100%（10/10）
23－3	花叶	75%（9/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
24	细叶	70%（7/10）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
25－1	板叶	50%（6/12）	100%（10/10）	—	/
26	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	100%（10/10）
27	板叶	91.66%（11/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
28	板叶	100%（12/12）	10%（10/10）	100%（10/10）	100%（10/10）
30	板叶	33.33%（4/12）	55.56%（5/9）	20%（2/10）	50%（5/10）
31	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	70%（7/10）
32－3	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
33	细叶	8.33%（1/12）	10%（1/10）	30%（3/10）	0%（0/10）
34	细叶	100%（12/12）	90%（9/10）	100%（10/10）	30%（3/10）
35－2	板叶	100%（8/8）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
36	板叶	100%（6/6）	100%（10/10）	100%（10/10）	100%（10/10）

续表

品种及叶子形状		病株率			
		温室接种后第 20d 20dpi *		大田接种后第 25d 25dpi	
		第一次试验	第二次试验	第一次试验	第二次试验
38	细叶	—	—	100%（10/10）	/
39	板叶	—	80%（8/10）	—	/
40	花叶	100%（12/12）	9%（9/10）	50%（5/10）	/
41 - 2	细叶	16.67%（2/12）	50%（5/10）	50%（5/10）	/
42	细叶	—	—	90%（9/10）	/
43	板叶	100%（6/6）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
44	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
45 - 1	细叶	16.67%（2/12）	10%（1/10）	10%（1/10）	20%（2/10）
46 - 4	细叶	8.33%（1/12）	50%（5/10）	60%（6/10）	0%（0/10）
47 - 2	细叶	8.33%（1/12）	60%（6/10）	50%（5/10）	0%（0/10）
48	细叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
49	细叶	—	—	40%（4/10）	/
50	细叶	50%（6/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
51 - 1	细叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
52 - 3	板叶	75%（9/12）	100%（10/10）	30%（3/10）	/
53	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	30%（3/10）	90%（9/10）
54	花叶	50%（6/12）	50%（5/10）	60%（6/10）	40%（4/10）
55	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
56	细叶	—	—	100%（10/10）	/
57 - 2	细叶	100%（12/12）	—	100%（10/10）	30%（3/10）
58	细叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
59 - 2	花叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
60	花叶	8.33%（1/12）	60%（6/10）	50%（5/10）	/
61	花叶	100%（12/12）	100%（10/10）	80%（8/10）	/
63	细叶	16.67%（2/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
64	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
65	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/
66 - 2	板叶	100%（12/12）	100%（10/10）	100%（10/10）	/

“dpi” 接种后天数；“—” 种子不发芽；“/” 没接种；“ * ” 括号中的数字为病株数/接种株数。

表 6-2 温室和大田雪菜的病情指数与抗病类型

品种及叶子形状		病情指数与抗病类型			
		温室第一次接种试验后 第 20d 20dpi		大田第一次接种试验后 第 25d 25dpi	
		病情指数	抗病类型	病情指数	抗病类型
1-3	板叶	33.33	T	33.33	T
3	板叶	48.15	S	—	—
4-1	花叶	28.89	T	33.33	T
5	细叶	2.78	R	28.89	T
6	板叶	35.19	S	—	—
7-1	板叶	34.26	S	37.78	S
8	细叶	2.78	R	6.67	R
9-8	花叶	12.96	T	10	R
10	板叶	33.33	T	33.33	T
11	细叶	2.78	R	3.33	R
12	板叶	37.04	S	33.33	T
13-1	细叶	2.78	R	10	R
15	板叶	55.56	S	37.78	S
16-2	细叶	2.78	R	3.33	R
17	板叶	55.56	S	60	S
18-5	板叶	33.33	T	33.33	T
19	板叶	35.19	S	55.56	S
20	细叶	9.26	R	10	R
21-1	细叶	27.78	T	24.44	T
22	板叶	55.56	S	66.67	S
23-3	花叶	41.67	S	40	S
24	细叶	38.89	S	77.78	S
25-1	板叶	27.78	T	—	—
26	板叶	55.56	S	48.89	S
27	板叶	50.93	S	64.44	S
28	板叶	59.26	S	62.22	S

续表

品种及叶子形状		病情指数与抗病类型			
		温室第一次接种试验后第 20d 20dpi		大田第一次接种试验后第 25d 25dpi	
		病情指数	抗病类型	病情指数	抗病类型
30	板叶	18. 52	T	14. 44	T
31	板叶	66. 67	S	51. 11	S
32 - 3	板叶	53. 7	S	55. 56	S
33	细叶	0. 926	R	10	R
34	细叶	33. 33	T	33. 33	T
35 - 2	板叶	33. 33	T	33. 33	T
36	板叶	55. 56	S	55. 56	S
38	细叶	—	—	44. 44	S
40	花叶	33. 33	T	16. 67	T
41 - 2	细叶	33. 33	T	16. 67	T
42	细叶	—	—	33. 33	T
43	板叶	40. 74	S	55. 56	S
44	板叶	61. 11	S	73. 33	S
45 - 1	细叶	5. 56	R	3. 33	R
46 - 4	细叶	2. 78	R	20	T
47 - 2	细叶	6. 48	R	16. 67	T
48	细叶	55. 56	S	60	S
49	细叶	—	—	13. 33	T
50	细叶	27. 78	T	44. 44	S
51 - 1	细叶	35. 19	S	44. 44	S
52 - 3	板叶	33. 33	T	16. 67	T
53	板叶	33. 33	T	16. 67	T
54	花叶	27. 78	T	33. 33	T
55	板叶	55. 56	S	66. 67	S
56	细叶	—	—	55. 55	S
57 - 2	细叶	33. 33	T	28. 89	T
58	细叶	33. 33	T	31. 11	T
59 - 2	花叶	35. 19	S	33. 33	T

续表

品种及叶子形状		病情指数与抗病类型			
		温室第一次接种试验后 第 20d 20dpi		大田第一次接种试验后 第 25d 25dpi	
		病情指数	抗病类型	病情指数	抗病类型
60	花叶	4. 63	R	23. 33	T
61	花叶	33. 33	T	26. 67	T
63	细叶	12. 96	T	33. 33	T
64	板叶	53. 70	S	55. 56	S
65	板叶	55. 56	S	57. 77	S
66 - 2	板叶	55. 56	S	88. 89	S

"dpi" 接种后天数；"—" 种子不发芽；"R" 抗病；"T" 耐病；"S" 感病。

表 6 - 3　各雪菜品种的 ELASA 测定

品种	oD_{405}		
	温室接种后第 25d 25dpi	大田接种后第 25d 25dpi	
	第一次试验	第一次试验	第二次试验
1 - 3	0. 490	0. 897	/
3	0. 736	—	/
4 - 1	1. 234	1. 184	/
5	1. 255	1. 113	0. 121
6	0. 704	—	/
7 - 1	0. 390	0. 703	0. 178
8	1. 262	1. 029	0. 101
9 - 8	0. 675	0. 508	/
10	1. 266	0. 619	0. 687
11	0. 482	0. 431	0. 148
12	0. 597	0. 752	0. 145
13 - 1	1. 264	0. 846	0. 115
15	0. 843	0. 661	/
16 - 2	1. 298	0. 447	0. 145

续表

品种	oD405		
	温室接种后第25d 25dpi	大田接种后第25d 25dpi	
	第一次试验	第一次试验	第二次试验
17	0.602	0.333	0.231
18－5	0.462	0.954	/
19	1.255	0.842	/
20	0.735	0.729	0.647
21－1	0.615	1.340	/
22	0.592	0.515	/
23－3	0.769	0.953	/
24	1.298	1.297	/
25－1	0.543	—	/
26	1.255	1.321	/
27	0.475	0.989	/
28	1.247	1.387	0.328
30	0.592	0.660	0.614
31	0.750	0.588	0.179
32－3	0.676	0.909	/
33	0.274	0.947	0.098
34	1.130	0.550	/
35－2	1.269	1.251	/
36	1.270	0.639	/
38	—	0.986	/
40	1.247	0.583	/
41－2	0.709	0.498	/
42	—	1.043	/
43	1.247	0.509	/
44	1.016	1.062	/
45－1	0.607	0.707	0.097
46－4	1.201	1.708	0.166
47－2	0.493	0.651	0.174
48	0.829	1.262	/
49	—	0.871	/
50	0.657	1.014	/

续表

品种	oD405		
	温室接种后第 25d 25dpi	大田接种后第 25d 25dpi	
	第一次试验	第一次试验	第二次试验
51－1	0. 715	1. 376	/
52－3	0. 671	1. 016	0. 245
53	0. 633	0. 473	0. 198
54	0. 491	1. 269	0. 165
55	0. 490	1. 238	/
56	—	0. 896	/
57－2	1. 270	0. 991	/
58	1. 293	0. 932	/
59－2	0. 755	1. 389	/
60	1. 214	1. 218	/
61	0. 735	0. 797	/
63	0. 480	1. 250	/
64－2	0. 639	1. 231	/
65	0. 590	0. 582	/
66－2	0. 598	1. 274	/
ck	0. 080	0. 116	/

“dpi” 接种后天数；“—” 种子不发芽；“/” 没接种。

表 6－4　温室第二次接种试验的各雪菜品种的 ELISA 测定

品种	oD405			
	温室接种后第 10d 10dpi *	温室接种后第 15d 15dpi	温室接种后第 20d 20dpi	温室接种后第 30d 30dpi
1－3	0. 916	1. 034	1. 186	1. 065
2	0. 111	0. 631	0. 560	0. 459
3	0. 445	0. 542	0. 714	0. 837
4－1	0. 641	0. 657	0. 889	1. 137
5	1. 266	1. 148	0. 974	1. 074
6	0. 992	0. 987	1. 050	1. 125

续表

品种	oD405			
	温室接种后第10d 10dpi *	温室接种后第15d 15dpi	温室接种后第20d 20dpi	温室接种后第30d 30dpi
7－1	1. 214	1. 224	0. 969	1. 133
8	0. 278	0. 487	0. 797	1. 152
9－8	0. 094	0. 239	0. 714	1. 132
10	0. 118	0. 755	0. 601	0. 802
11	0. 104	0. 654	0. 603	0. 817
12	0. 108	1. 226	1. 062	1. 103
13－1	0. 182	0. 760	1. 275	1. 194
14	1. 018	1. 146	1. 132	1. 020
15－1	0. 111	0. 176	1. 055	1. 170
16－2	0. 095	0. 670	1. 034	1. 223
17	0. 126	0. 870	0. 916	1. 022
18－5	0. 091	0. 089	0. 919	1. 217
19	0. 125	0. 174	0. 792	1. 146
20	0. 137	1. 012	0. 994	0. 965
21－1	0. 121	0. 435	0. 670	0. 728
22	0. 166	0. 210	0. 892	1. 163
23－3	0. 829	1. 036	1. 109	1. 126
24－2	0. 099	0. 090	0. 798	0. 657
25－6	0. 102	0. 773	1. 222	1. 174
26	0. 112	0. 692	1. 103	0. 941
27	0. 110	0. 643	0. 883	1. 225
28	0. 483	1. 220	1. 070	0. 995
30	0. 112	0. 987	0. 912	1. 121
31	0. 404	0. 405	1. 207	1. 234
32－3	0. 345	0. 778	0. 965	1. 143
33	0. 093	0. 270	0. 889	1. 088
34	0. 102	0. 567	0. 615	0. 843
35－2	0. 113	0. 715	1. 136	1. 106
36	0. 128	1. 202	1. 061	0. 934
39	0. 146	0. 684	0. 789	0. 762

续表

品种	oD$_{405}$			
	温室接种后第 10d 10dpi *	温室接种后第 15d 15dpi	温室接种后第 20d 20dpi	温室接种后第 30d 30dpi
40	0. 101	0. 763	1. 068	1. 118
41 - 2	0. 495	1. 170	0. 944	1. 147
43	0. 798	0. 783	0. 762	1. 146
44	0. 904	1. 097	0. 933	0. 702
45 - 1	0. 121	0. 180	0. 949	1. 164
46 - 4	0. 119	0. 586	1. 178	1. 056
47 - 2	0. 180	0. 641	0. 804	0. 878
48	0. 592	0. 560	0. 948	1. 050
50	0. 098	1. 013	1. 110	1. 127
51 - 1	0. 108	1. 088	0. 910	0. 894
52 - 3	0. 804	0. 946	1. 075	1. 153
53	0. 595	0. 983	0. 950	0. 934
54	0. 113	0. 590	0. 775	1. 160
55	1. 167	0. 983	1. 140	1. 067
58	0. 762	1. 101	1. 123	1. 024
59 - 2	0. 484	0. 539	0. 903	1. 044
60	0. 612	0. 822	0. 999	0. 630
61	1. 078	0. 919	1. 006	1. 178
63	0. 846	0. 611	0. 618	0. 686
64 - 2	1. 050	1. 142	0. 970	1. 023
65	0. 465	0. 972	1. 154	1. 129
66 - 2	0. 859	0. 881	0. 902	0. 969
ck	0. 092	0. 087	0. 099	0. 118

“dpi” 接种后天数；“—” 种子不发芽。

鉴于不同类型品种间对雪菜病毒病的抗性有不同表现，但即使在同一类型中，例如板叶型品种中不同品种的抗性表现也存在差异，不可能同一。同时鉴于板叶型雪菜是宁波地区的当家品种，为从现有板叶类型品种中选出育种亲本，周书军、唐爱章、叶培根等人于 2003 年 10 月至 2004 年 4 月选择了板叶种中比较耐病的几个品种，在宁波市鄞州区邱隘镇精农园区进行了板叶型雪

菜田间品种对比试验。

田间参试的板叶类型雪菜主要品种有鄞雪 18（18-1-2）、鄞雪 26（26-5-3）、鄞雪 31（31-10-2）、鄞雪 12（12-2-4）、鄞雪 10 号（10-8-1），对照品种为本地传统黄叶种；各试验品种小区面积 $30m^2$，每小区设 4 次重复，随机排列。

对比试验区于 2003 年 10 月 13 日播种，11 月 26 日移栽，亩栽 4 500株。每小区种植 200 株。肥水管理同常规大地；从播种到收刈，对栽培全过程进行观察，统计病毒病的发病率，收获时折算产量。试验结果如表 6－5。

表 6－5　5 个板叶型新品种与对照品种产量对比分析　单位：kg

品种名称及编号	各重复小区产量				小区产量总和	小区平均产量	折合亩产	比对照增减		位次
	1	2	3	4				kg	%	
1 鄞雪 10	236	217	243	243	939	235	4 700	920	24.3	5
2 鄞雪 12	267	250	253	253	1 023	256	5 120	1 340	35.5	2
3 鄞雪 18	257	253	240	253	1 003	251	5 020	1 240	32.8	3
4 鄞雪 28（CK）	191	189	193	185	758	190	3 780	—	—	6(Ck)
5 鄞雪 26	233	243	233	240	949	237	4 740	960	25.4	4
6 鄞雪 31	260	260	267	260	1 047	262	5 240	1 460	38.6	1

＊＊重复内小区产量总和　1444 1442 1429 1434T＝5719。

试验结果表明：5 个板叶型雪菜新品种与对照相比，其产量差异均呈极显著水平。其中以鄞雪 31 号产量最高，亩产 5 240kg，比对照增产 38.6%；鄞雪 12 号居次，比对照增产 35.5%；鄞雪 18 号居第 3 位，比对照增产 32.8%（该品种由于株型为直立型，移栽密度每亩 5 000～5 500株，因此，其品种的丰产性尚有很大潜力，在一般大地栽培中，产量高于鄞雪 31 号）；鄞雪 26、鄞雪 10 号分别居第 4、第 5 位，分别比对照增产 25.4% 和 24.3%；5 个板叶品种对病毒病的抗性均优于当地品种，其中鄞雪 10 号 3 月 1 日见病，鄞雪 12 号 3 月 11 日见病，鄞雪 26 号 3 月 22 日见病，3 个品种各见 1 株发病株，以后未见扩散，到收获时，3 个品种的株发病率仍停留在 0.125%，对产量没有影响。可见有较强的

耐病性。鄞雪 18 号、鄞雪 31 号始终未见发病株。而作对照的本地黄叶种于 12 月 25 日见病，到收获时株发病率达 19.5%。

此外，经在宁波市鄞州区瞻岐、咸祥等乡镇的大面积生产考核，也表明鄞雪 18 号与邱隘黄叶种等当地板叶种相比，具有较强的耐病性、丰产性，可作为育种亲本。

第二节 育种目标与育种方式

一、育种目标

雪菜的育种目标应达到以下要求：

（1）增产。有较高的产量，一般要求春菜亩产 5 000kg 以上；冬菜 4 000kg 左右。

（2）优质。要求色泽黄亮、纤维素含量低，腌制品口感松脆，鲜美，有雪菜特有的清香。

（3）抗雪菜病毒病或强耐雪菜病毒病。

（4）熟期较迟，春菜在 4 月上、中旬抽薹。

二、育种方式

（一）常规育种

作物育种的最基本方法，即从现有品种群体中选择优良自然变异个体，通过后代鉴定，保纯繁育，育成新品种。适用于自花授粉和常异花授粉作物，也用于无性繁殖作物的芽变选择。

雪菜属十字花科芸薹属，是异花授粉作物，可以采用以下方法进行操作：

（1）从原有品种群体中选择优良个体分别套袋、留种，当年或翌年以每一个体种子为单位，分别单种一小区，通过个体后代间相互比较，选出优良单系。这种方法即个体选择法，是纯系育种的关键，其效果取决于以下一些因素：①基础材料。供个体选择用的品种群体要经济性状优良、适应性广、遗传变异率高。一

般以当地大面积种植或由杂交育成的新推广品种为佳。前者经广大地区长期种植，类型变异较多，可提供较为丰富的遗传变异；后者遗传性状尚未充分稳定，仍有剩余变异可资利用。此外，品种引至新的生态条件下种植时，常会引起遗传基因的不同表达，出现与原产地不同的新类型，如其主要性状基本符合要求，则选择的余地更大。一般可对供选择的原有群体先进行品种比较试验，再从优良群体的繁殖区中选择优良个体。②选择标准。在肥力均匀、植株营养面积相近、管理措施一致的田块进行选择，可减少因环境差异引起的不遗传变异。凡所处条件优越者，如邻株矮小、晚发或缺株等，选择标准应适当提高；反之，受邻株影响较大或密度较高的地段，选择标准可酌情降低。③选择时间。品种性状是在不同的生长时期和条件下显现的，故以分阶段在各个性状表现最明显、最易于区别其间的差异时鉴定，并分次选择为宜。如对雪菜病毒病的抗性，多表现在冬菜与春菜的苗期；抽薹迟早，则表现在春菜采收期。对当选植株要随时做好标记，以便在田间根据阶段性表现进行综合评定和决选。④选择数量。一般纯系品种的自然变异频率较低，出现优良变异的机会更少。为提高选得优异个体的概率，供选择的原有品种群体不宜太小。如在一个新地区开展纯系育种工作，则其品种考察范围要扩大，个体选择的数量可自几千至几万；规模较小的也可选择几十、几百至上千个个体。

（2）育种程序。一般为：①株行（系）试验，又称株行（系）圃试验。即一个当选个体的种子栽种 1 行或几行（小区），相互进行比较。行长因试验地条件而定，要设对照品种。通过田间观察、室内考种和初步测产，选留少数优良单系（由一个个体繁殖出的后代），升入鉴定圃。其中表现虽好但性状尚有分离的，可继续从中选择优良个体，参加下一年的株行（系）试验。这种经 2 次以上的个体选择，称多次个体选择法。②鉴定圃试验。即上年当选的单系各成为一个品系，对之进行初步的产量比较。为此必须采用适当的田间试验设计，重复 2～3 次，并设对照区，

以便估测品系间在产量及其他经济性状上差异的显著性。生长期中进行系统观察记载，最后根据产量、田间表现和室内鉴定结果，选出少数综合表现优于对照品种的品系，供进一步进行品种预备试验和比较试验。③品种预备试验和比较试验。品种试验的方法与鉴定圃试验基本相同，但小区面积适当加大，重复3～4次，大都采用随机区组设计，参加比较试验的品系数较少。除生长期间系统观察记载经济性状和主要特征、特性外，还要进行抗性鉴定和品质分析，最后根据产量及其他各方面的综合表现，选出1～2个最优的品系作为本单位育出的新品种，申请参加区域试验。品种预备试验可进行1～2年，品种比较试验进行2～3年。在品种比较试验的后期可设置生产试验，探索品种的栽培要求，以便品种认定后能和相应的栽培技术配套推广。

（二）杂交育种

遗传性不同的植物，通过有性杂交所产生的杂种后代较双亲有强大的生长优势、抗逆性、适应性和生产能力的现象，叫做“杂种优势”。在杂种优势利用中，一般杂种第一代的优势明显，整齐一致。而以后的世代则优势下降，并出现分离，从而失去利用价值。因此生产上杂种优势的利用，主要是利用一代杂种。目前，杂种一代优势利用，已成为育种工作中的一条有效途径。

雪菜通过杂交育种，杂种优势十分显著。优良的杂种一代具有丰产、早熟、整齐一致、成熟集中、品质好、抗逆性强的优点。而且雪菜种子繁殖系数高，单位面积用种量小，因此利用杂种优势在生产上有广阔的前途。

目前，蔬菜杂种优势的利用，主要有品种间杂交、自交系杂交、自交不亲和系杂交、雄性不育系杂交四种方式。但迄今在生产上推广应用的十字花科蔬菜第一代杂种，大部分都是利用自交不亲和系配制的一代杂种。利用自交不亲和系作为配制杂种一代的亲本，进行自由杂交时不用去雄，可得到杂交率100%的杂交种，这不仅降低了配制杂种种子的成本，而且将大大促进一代杂种的推广。因此，为提高自然杂交制种的杂交率，在雪菜育种上

多是利用自交不亲和系来配制杂种一代。

第三节　强耐雪菜病毒病品种选育案例

一、常规育种方式选育案例

宁波市鄞州区雪菜开发研究中心选育编号为18（上海加长种）的强耐雪菜病毒病的18-1-2-8单株，前后经历了4代。新选出的株系表现了较原引入品种（上海加长种）、当地传统品种（邱隘黄叶）有较高的产量，并且强耐雪菜病毒病，现已基本覆盖鄞州全区。

（一）选育的技术思路和选育过程

1. 品种选育的总体技术思路

第一步：广泛搜集当地优良的地方品种，以及长江流域各省、市的品种；

第二步：在鄞州区雪菜开发研究中心建立雪菜品种资源圃，进行集中对比观察；

第三步：根据观察对比结果，筛选出比较高产、优质、抗雪菜病毒病、生育期适中的品种，将其单株列为育种亲本；

第四步：根据雪菜是异花授粉作物，且具有自交不亲性的特点，对选定的几个主要雪菜品种各选10株优良单株，在其单株（花）上进行人工套袋自交，然后从其后代选出10株产生变异的自交系；

第五步：将10个自交系分别播种、移栽，并与引种来的原始种和当地主栽品种相比较，考察其性状差异，从中确认最佳株系；

第六步：对确认的优良株系再次选出10株优良单株，重复第四、第五步操作，再次确认最佳株系，观察其是否可以遗传；

第七步：扩大繁殖优良株系，开展多年多点品种对比试验，继续与引种来的原始种和当地主栽品种比较，分析其产量、品

质、抗性和生育特性；

第八步：开展新品系栽培示范试验，逐步示范推广。

2. 选育过程

（1）2000 年秋至 2001 年春，在雪菜品种资源圃对 35 个品种进行了对比试验，从中选出了 9 个表现较好的品种，并对编号为 18 的品种（来自嘉兴市七星镇的上海加长种，又名七星黄叶）套袋自交，采收其形态特征、熟期等有差异的 10 个株系的种子，分别编号为 18-1 至 18-10，于同年秋季继续对比试验，结果 18-1 株系有较好的产量与抗性表现。

（2）2002 年春，在选出的 18-1 株系栽植区内，选出 18-1-1 至 18-1-10 共 10 株系，进行套袋自交，并于同年秋季进行株系间的对比试验，结果 18-1-2 株系在产量、抗性、品质等方面优于其他株系和上海加长种（亲本）及当地主栽品种邱隘黄叶种。

（3）2003 年春分别对 18-1 和 18-1-2 进行株系繁种；同年秋季由鄞州区雪菜协会安排在邱隘、咸祥、瞻岐、云龙 4 个乡镇 5 个雪菜加工企业进行试种并进行区域品种对比试验，结果 18-1-2 株系在产量、抗性、品质等方面优于其他株系和上海加长种（亲本）及当地主栽品种邱隘黄叶种，并将 18-1-2 暂命为“鄞 18 号”。2004 年春继续进行品种对比试验，从 18-1-2 中选出 18-1-2-1 至 18-1-2-10 共 10 个株系，套袋自交。

（4）2003 年冬至春，宁波引发绿色食品有限公司、紫云堂食品有限公司组织较大面积的 18-1-2 试种示范。2004 年 3 月 28 日“雪菜品种资源圃的建立与良种选育”项目通过宁波市科技局鉴定，将 18-1-2-8 品系暂名为鄞雪 18 号。2004 年秋，对 18-1-2-1 至 18-1-2-10 等 10 个株系进行 3 点对比试验，确认 18-1-2-8 表现较好。

（5）2005 年春，进一步繁育 18-1-2 和 18-1-2-8 株系；同年秋季对 18-1-2-8 与上海加长种（亲本）及当地主栽品种邱隘黄叶种进行对比试验，18-1-2-8 有突出表现。

（6）2006 年春，18-1-2-8 株系在鄞州区多点试种，并在雪菜

主产区邱隘、瞻岐、咸祥 3 镇继续进行品种对比试验和种子繁育。同年，《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》项目通过宁波市科技局验收，参试的 18-1-2-8（鄞雪 18 号）表现对雪菜病毒病有较强的抗（耐）病性。

（7）2007 年春，扩大 18-1-2-8 示范，并开展鄞雪 18 品种认定申报工作。

（二）品种的考核与应用

1. *产量考核*

2004 ~ 2007 年，鄞州区雪菜开发研究中心对鄞雪 18（18-1-2-8）品种进行了比较试验，结果见表 6 – 6 所述：

表 6 – 6　鄞雪 18（18-1-2-8）与原品种及当地主栽品种的产量对比

类型	亩产（kg）			比 CK1 增、减%	比 CK2 增、减%
	18-1-2-8	上海加长种（CK1）	邱隘黄叶种（CK2）		
2004 年冬菜	5 600	4 510	3 800	24. 17	47. 37
2005 年春菜	5 532	4 824	3 897	14. 68	41. 96
2005 年冬菜	5 687	4 877	4 076	16. 66	39. 52
2006 年春菜	5 577	4 786	2 967	16. 53	87. 97
2006 年冬菜	5 706	4 759	3 511	19. 9	62. 52
2007 年春菜	5 357	4 739	3 599	13. 04	48. 85
平均	5 577	4 749	3 642	17. 42	47. 37

其中鄞雪 18（18-1-2-8）冬菜平均亩产 5 664kg，比上海加长种（CK1）增长 20. 24%，比邱隘黄叶种（CK2）增长 49. 8%；春菜平均亩产 5 489kg，比上海加长种（CK1，增长 14. 75%，比邱隘黄叶种（CK2）增长 59. 59%，增产均极为显著。

同时，又分 3 个点，即宁波市鄞州区的邱隘、咸祥进行了连续 7 年春冬两季的品种对比与生产示范试验，鄞雪 18（18-1-2-8）品种均表现良好（表 6 – 7）。

表 6－7 2001～2007 年鄞雪 18（18-1-2-8）品种多点品种对比与生产试验情况

年份	产量（kg/亩）				增幅（%）		备注
	新品（株）系		上海加长种（CK1）	邱隘黄叶种（CK2）	比 CK1	比 CK2	
	名称	亩产					
2001	18-1 冬菜	5 120	4600	2480	11. 3	106. 45	对比试验
2002	18-1 春菜	5 407	4866	3695	11. 12	46. 33	对比试验
	18-1-2 冬菜	5 440	4400	3800	23. 64	43. 16	对比试验
2003	18-1 春菜	5 217	4908	3976	6. 3	31. 21	生产示范
	18-1-2 冬菜	5 514	4822	4150	14. 35	32. 87	对比试验
2004	18-1-2 春菜	5 227	4376	3752	10. 37	39. 31	生产示范
	18-1-2-8 冬菜	5 600	4510	3800	24. 17	47. 37	对比试验
2005	18-1-2-8 春菜	5 532	4824	3897	14. 68	41. 96	生产示范
	18-1-2-8 冬菜	5 687	4877	4076	16. 66	39. 52	对比试验
2006	18-1-2-8 春菜	5469 邱隘 5455 咸祥 5808 瞻岐 平均 5577	4877 邱隘 4758 咸祥 4722 瞻岐 平均 4786	2895 邱隘 3014 咸祥 2993 瞻岐 平均 2967	16. 53	87. 97	对比试验
	18-1-2-8 冬菜	5662 邱隘 5751 咸祥 5707 瞻岐 平均 5706	4821 邱隘 4617 咸祥 4838 瞻岐 平均 4759	3586 邱隘 3491 咸祥 3457 瞻岐 平均 3511	19. 9	62. 52	对比试验
2007	18-1-2-8 春菜	5427 引发 5328 三丰 5306 大地 5322 万胜 平均 5357	4832 引发 4725 三丰 4766 大地 4683 万胜 平均 4739	3742 引发 3683 三丰 3752 大地 3217 万胜 平均 3599	13. 04	48. 85	对比试验

2. 对病毒病的抗性表现

（1）病原鉴定。经浙江大学生物技术研究所对116株呈花叶症状的雪菜病毒样品三抗体夹心（TAS）ELISA检测表明：97株雪菜花叶样本均检测到芜菁花叶病毒（TuMV），所有的样本都没有检测到黄瓜花叶病毒（CMV）和烟草花叶病毒（TMV）；利用免疫捕捉反转录PCR（IC－RT－PCR）对部分TuMV样本中的CP和HC－Pro基因进行了扩增，所有样品都得到约0.8kb和1.4kb的两条特异条带，因此宁波雪菜病毒病的主要病原是TuMV。通过实验室对雪菜品种的抗（耐）病毒病鉴定，57个雪菜栽培品种分别进行温室和大田人工接种，以鉴定其对TuMV抗性。温室和大田接种试验鉴定出抗TuMV的雪菜品种有7个，耐病品种22个，感病品种28个，未发现高抗品种。利用TAS－ELISA方法对接种雪菜中的TuMV浓度进行了测定，在TuMV接种后10d、15d、20d和30d，57个雪菜品种中TuMV阳性检出率分别为46.55%、91.38%、100%和100%。

（2）品种资源圃病情调查。经试种来自浙江省、上海市、河南省、湖北省、湖南省、江西省、江苏省、四川省、安徽省和香港特别行政区的66个品种雪菜品种，调查温室雪菜接种后20d和大田雪菜接种后25d的病株数及病株率。2003～2004年实验室雪菜4次接种后，在出芽的56个雪菜品种中，感病品种25个，耐病品种20个，抗病品种11个。大田接种试验中出芽的57个品种中，感病品种24个，耐病品种25个，抗病品种8个。表明感病品种大多数是板叶型雪菜，而抗病品种绝大多数是细叶型雪菜。TAS－ELISA检测测试数据表明鄞雪18号（18-1-2株系）属耐病品种。

（3）田间品种抗性比较试验。2003年10月至2004年4月选择鄞雪18与邱隘黄叶种（CK2）进行田间品种比照试验，鄞雪18发病率为0，产量比邱隘黄叶种增32.8%；邱隘黄叶种于12月25日见病，收获时株发病率19.5%。在鄞雪18号的选育过程中，18-1、18-1-2、18-1-2-8株系一直未见病株，发病率为0；上

海加长种（CK1）株发病率为3%～7%；邱隘黄叶种（CK2）的株发病率20%～40%。

3. 品质考核

雪菜主要通过腌制后进行加工，而不是鲜食，因此腌制品质是雪菜品质的主要指标。为此宁波市鄞州区绿原雪菜开发研究中心对鄞雪18（18-1-2-8株系）与其他雪菜品种进行了分缸腌制，然后分送市、区有关单位和专家进行咸菜质量评估。评估内容为色、香、味、形四项，按好、较好、一般、较差、差五级评定。评定结果，鄞雪18（18-1-2-8株系）品种综合指标位居第一，邱隘黄叶种居第二，上海加长种居第三。此外，鄞雪18因其叶柄细长，叶较窄，与邱隘黄叶种相比腌制成品度高9%～13%，加工成品率高11%，腌渍后有香味，品质好，适宜作为雪菜加工品种；缺点是腌制产品（咸菜）脆性较差，不如邱隘黄叶种。

4. 鄞雪18号（18-1-2-8株系）的应用

（1）品种主要特性。鄞雪18号株高约46cm，开展度76cm×72cm，株型直立且紧凑；分蘖性较强，成株有分叉28个左右；叶绿色、倒卵形，长44.6cm，宽10.9cm，叶缘大锯齿嵌小锯齿，缺刻自叶尖至叶基由浅渐深，近基部全裂，有小裂片3～5对，沿叶缘有一圈紫红色条带，叶面较光滑，无蜡粉和刺毛单株，总叶片309张左右；叶柄浅绿色，背面有棱角，长7.4～15cm，宽1.3cm，厚0.6cm，中肋大，横断面呈弯月形；抽薹开花期较上海加长种迟5～7d；尚未见病毒病发生。上海加长种株高约44cm；分蘖性强，成株有分叉32个左右；叶缘草绿色，无红色斑点；叶柄较细，宽1.1cm；病毒病株发病率3%～7%。此外，鄞雪18的品质和可加工性状优于上海加长种。

（2）适宜推广的区域及目前推广应用情况。本品种适宜在长江流域土壤pH值呈微酸性或微碱性的地区栽培推广。目前鄞州区已基本全区覆盖，2007年春菜推广面积10 000亩，秋菜栽培面积8 000亩。宁波市其他县市、绍兴市、江西省、江苏省也有一定面积种植，广东、深圳等地已经试种。

（3）繁种育种技术要点。

①选择本品种的纯种作为种源。选叶片边缘有红斑、抽薹迟、分枝多且均匀的植株留种。

②选择隔离条件好的地域育种。与十字花科作物的隔离距离不得少于500m。

③育苗时要认真清除杂株。

④适期播种、适期移栽。宁波市播种适期为10月16～21日，移栽适期为11月25～30日。

⑤增施有机肥与磷钾肥，控制化学氮肥，防止氮肥过量。

（4）栽培技术要点。

春菜（亩目标产量5 000kg）栽培技术要点：

①苗床选择。选择靠近大田栽培、土壤肥沃、排水良好、多年未种过十字花科作物的黏性壤土，如选用西瓜地等旱地做苗床，应在播种前深水漫灌3d，再放水搁燥翻耕，以减少病菌感染。

②高标准平整苗床。耕翻起沟后细锄，达到深沟、平畦、泥碎。施足基肥并用农地乐等杀虫剂作土壤处理。

③适期适量播种。宁波地区春菜适宜的播种期以10月12～20日为宜，亩播种量150～250g

④苗期管理。

Ⅰ. 间苗匀苗。幼苗1～2片真叶时开始间苗，3～4叶时第2次间苗，删去密集苗、徒长苗、细弱苗、无心苗、病苗及其他劣苗，苗距掌握两指宽即3～5cm，当苗长至有5～6片真叶，苗高10～13cm时定苗，苗距3指宽（或每平方米有苗135株），秧本比1∶15，结合手工拔除杂草。

Ⅱ. 肥水管理。如苗期干旱，应早晚浇水，但浇水不可太多，否则易造成霉根。结合浇水、匀苗，4叶期后视苗情，每亩施尿素2.5～3kg对水拨浇或浇施1∶8～10的腐熟人粪便，移栽前5～6d施起身肥，每亩用尿素4～5kg。

Ⅲ. 病虫害防治。苗期害虫主要有蚜虫、青虫和黄条跳甲。

根据虫情用80%敌敌畏乳剂2 000倍液、晶体敌百虫1 000倍液、吡虫啉2 000倍液等药剂防治。

⑤移栽管理。

Ⅰ. 适时移栽，确保移栽质量。宁波市春菜移栽的适期，一般在11月下旬至12月5日前。

Ⅱ. 确保移栽质量。移栽前要施足基肥，起沟前本田亩用过磷酸钙40kg + 碳铵40kg + 复合肥40kg，或腐熟猪肥2 500kg（或鸡粪10 ~ 12箩）+复合肥25 ~ 30kg作底肥；每畦净畈1.55m，沟宽0.25m，行株距0.35m × 0.3m，沟泥上畈，锄碎，移栽密度每亩5 000 ~ 6 000株。

Ⅲ. 移栽后管理。移栽后及时补苗，施好追肥。年内施肥，第一次在栽后20 ~ 30d，第2次春节前，分别亩用尿素5 ~ 7kg加过磷酸钙40kg加水1 000 ~ 1 500kg；年外施肥，第1次在雨水前后（2月中旬），第2次在惊蛰与春分之间（3月10 ~ 15日），每次每亩分别在行间开浅沟条施尿素15kg加氯化钾10 ~ 15kg，并清沟覆土。此外，认真做好病、虫、草害防治工作。

⑥适时收获。春菜在4月15 ~ 20日，以薹与叶相平时（薹长8 ~ 10cm），选晴天下午采收为宜。

冬菜（亩目标产量4 000kg）的栽培技术：

冬菜栽培技术与春菜基本相似，但因冬菜秧苗期和生长前期气温较高，特别在干旱年份，易发生病毒病危害，因此更应重视轮作和选用抗病毒病品种，培育壮苗、带土移栽、深沟高畦、加强肥水管理、增施磷钾肥等综合措施。

①适时播种：可适当迟播，冬菜的播种期以在处暑（8月23日）前后播种为宜，避开高温，减轻病毒病危害。此外播种前一天要浇足底水，以利出苗；播后用银灰色防虫网隔离育苗，预防蚜虫，减轻病毒病危害；移栽起苗前，喷施“一遍净”防治蚜虫，带药移栽。

②适时移栽搞好本田期管理：冬菜移栽时间一般在9月下旬，苗龄25 ~ 30d，移栽的行株距比春菜要紧一些，一般畦宽

（连沟）1.5m，种4行，株距27cm，亩定植6 400株左右。定植时间最好选择在晴天下午3时以后或阴天进行，带土移栽（在移栽的当天上午，将苗床浇透水，起苗时用菜刀在苗床上划块，使根系带土）。移栽时施塞根肥并施搭根水，以利根系和土壤密切接触，提高秧苗成活率。定植后要早晚浇水，有条件的可在畦面覆遮阳网，以利成活。生长前期，如天气干旱时可在傍晚沟灌，但不能漫灌。定植活棵后及时追肥，追肥3～4次，每次每亩用腐熟人粪肥750～1 000kg或尿素7.5～10kg对水浇施，用肥量逐步增加。收获前25d施重肥1次，每亩用尿素15kg或碳铵30kg，加氯化钾10kg，以提高产量，改善品质。为防治蚜虫，预防病毒病，移栽后每隔7～10d喷施吡虫啉各1次。

③适时采收：冬菜生育期较短，除30d左右秧龄外，本田生长期一般为60d左右，多在小雪前后采收。

二、杂交育种方式选育案例

（一）应用的技术依据

1. 自交不亲和性的遗传机理

所谓自交不亲和系，就是指同一系统内株间花期交配结籽很少，而系间交配结籽正常的系统。自交不亲和系的雌蕊和花粉的形态、功能正常，只是由于遗传上的原因，使得同系内株间互相授粉时的受精过程不正常，但蕾期授粉可以结实。自交不亲和系的遗传机理，目前还在研究之中，有多种假说，如“互补刺激说”和“互拒抑制说”。有人认为自交不亲和的原因是由于柱头能产生一种抑制物，使具有同一基因的花粉不能发芽，但这种抑制物在蕾期没有成熟，所以蕾期授粉可以结实。

2. 优良自交不亲和系的选育

自交不亲和系的选育是采用连续自交分离和定向选择的方法。雪里蕻一般品种内的自交不亲和株比率是很高的，从品种内自行选育也是比较方便的。鄞州区雪菜开发研究中心，2002年对雪菜19个品种的215个单株测定的结果，选出163株亲和指数小

于1的不亲和单株，占总自交株数的75.8%。

（1）自交不亲和系的选育程序。自交不亲和系的选育方法是：根据确定的选育目标，在搜集和纯化原始材料、亲本经济性状鉴定、组合选配和组合力测定的基础上，从一些经济性状优良、组合力强的品种中，选择一些优良单株（一般10~20株）进行花期套袋自交。同时在同株的另一些花枝上进行蕾期自交。但人工自交的结实率高低，受到环境条件、授粉技术水平的影响很大。虽然，柱头受精有效期能延续到开花后7~8d，但结实率从开花后的第3d、第4d起就会逐渐下降；花粉生活力在自然条件下，从开花后也逐渐降低，因此，在一个自交不亲和株花梗上，同时授粉10朵以上的花，所得的结实率就可能偏低。此外，授粉不周到或损伤雌蕊，授粉工具和手指消毒不周到或授粉过程中风吹花粉的污染，或用老花粉授粉都会降低结实率，造成不亲和株的假亲和现象。因此，为了使测定的结果可靠，除应注意授粉操作外，最好在同一花枝上选用开花期不超过两天的花朵，确保每一植株至少授粉30朵以上，并做到尽可能选用主轴花枝的中下部花朵，按照30朵以上花朵数量分配。每株至少需3~4条花枝，并另加3~4条花枝作为蕾期授粉之用。

如果株上可用花枝数不多，也可以在同一枝上同时进行蕾期和花期两种授粉。但必须把即将开放的大花蕾摘除3~4个，作为蕾期和花期的界线，以免影响以后对花期和蕾期结实指数的统计。花期自交的目的，是检验亲和性；蕾期自交的目的是繁殖自交种子。种子成熟后要分别收获并统计亲和指数。亲和指数以“结籽数/授粉花数”表示。目前，在雪菜的杂交育种上，多将亲和指数定为1，低于1者为不亲和，高于1者为亲和。由于中选株系的不亲和性在最初几代还会分离，所以对它的自交后代要连续进行花期自交不亲和性的测定，每年都要选择那些亲和指数低、性状优良、整齐一致的植株留种，而且每一系统至少要有10株左右，直到不亲和性稳定为止。

自交不亲和系要求系内植株在花期授粉时也表现不亲和，所

以在自交不亲和性测定中，还要进行花期系内互交，测定系内不亲和性。最终选择系内交配不亲和和蕾期授粉结实率高的为优良的自交不亲和系。

（2）测定系内株间交配不亲和性的方法。测定系内株间不亲和性有多种方法。但不论选用何种测定方法，都要随机取样，一般样株数定为 10 株，只有客观地进行测定，才能得到比较可靠的结果。

可选用的测定方法有：

①全组混合授粉法。是将 10 株植株的花粉混合后，就用这 10 株作母本，分别授以混合花粉。

②半混合花粉交叉配组法。是将 10 株植株分为甲、乙两组，甲组 5 株的混合花粉分别授给乙组的 5 株；乙组的 5 株混合花粉分别授给甲组的 5 株，相互交换。

③半混合花粉单向配组法。是将 10 株植株分为两组，每组 5 株，甲组为父本，乙组为母本。把甲组 5 株的混合花粉分别授给乙组的 5 株，不反交。

④对配正反交法。是将 10 株分成 5 对，每对进行正反交，也是 10 个组合。

⑤对配单向交法。是将 10 株配成 5 对，只配制正反交之一。

⑥轮配法。是将 10 株植株的每一株，既作父本又作母本，与其他各株交配，包括全部株间组合的正反交和自交，共计 100 个组合。

⑦隔离区自然授粉法。是将 10 株植株栽在同一隔离区内，任其株间自然授粉。

测定系内株间交配亲和性时，究竟采用哪一种方法，要依据具体情况确定。有设置隔离区条件的，首先应考虑采用隔离区自然授粉法。如果检测结果发现系内株间授粉的结实指数较高，可以再对这些株系采用轮配法测验。若设置隔离区有困难，但又想加快选育过程而对 S1（杂交第 1 代）或 S2（杂交第 2 代）就可测定它们的系内株间交配亲和性，最好用半组混合花粉交叉配组

法，对同一批试材在整个花期内，要进行两次测验，两次的5株混合花粉要各不相同；或采用两次全组混合授粉法或半组单向配组法。在发现系内交配结实指数高的株系时，再对这些株系用轮配法测验。对于S3（杂交第3代）或S4（杂交第4代）的株系可以考虑采用一次半组混合花粉单向配组法或对配单向交配法。

（3）优良自交不亲和系应具备的特性。

①自交不亲和性要稳定。一个优良自交不亲和系的自交不亲和性的稳定，主要表现在花期自交不亲和，系内株间花期异交也高度不亲和。同时在不同环境条件下，不论在任何地区，在任何年份，在温室还是在塑料拱棚或露地纱罩内，不亲和性也是稳定的。

②蕾期授粉结实率高。蕾期授粉结实率高，才能获得较高的亲本种子产量，节省人工，降低一代杂种的生产成本。这也是衡量一个自交不亲和系有无利用价值的重要标志。

③具有良好的品种特性，植株性状优良，整齐一致。

④生活力衰退慢，退化程度小。

⑤配合力好，自然杂交结实率高，配制的杂种优势显著。这是一个重要条件，如这条不具备，其他条件再好，也不宜选作杂交亲本。

3. 亲本组合选配和组合力测定

在整个自交不亲和系选育过程中，需要进行自交不亲和性、组合力和经济性状三方面的分离选择工作。根据育种目标，选用恰当的亲本，配置合理的组合，叫做亲本选配，它是杂交育种的一个关键环节。亲本选配得当，后代出现的优良类型多，容易选出优良组合。为了正确选配亲本，必须对亲本材料进行细致的研究，在掌握其特征、特性及遗传规律的基础上，做好选配工作。

（1）选配亲本的原则。

①要选择有优良丰产性状和相对性状差异较大的材料为双亲。首先，亲本必须具有符合选育目标要求的优良性状，当双亲都具有优良性状时，杂交后代可能会全部或大部表现这种优良性

状，这些优良性状越多，杂种一代表现越好。实践证明，双亲某些相对性状如板叶与细叶、叶色深绿的与淡黄绿色的……，差异越大，其杂种一代优势越明显。

同时，在育种工作中，还应依据选育目标分清主次，如选育抗病、丰产的雪菜品种（组合），亲本之一必须具有抗病性、丰产性。此外，还要考虑成熟期、品质、叶色、叶形等性状特征。

②在亲本组合选配中，使双方各自缺乏或不足的性状能够互补。优良性状的互补，一般有两个含义：一是不同性状的互补，如选育雪菜抗病品种（组合），一个亲本有抗病优点，另一个亲本有优质的优点，使之相互互补；二是同一性状，不同构成因素的互补，如以雪菜丰产性为例，有些品种产量的构成是分蘖性强，分枝多、叶片多，另一些品种则是叶柄较粗，叶片大，用具有这两种不同产量构成因素的品种配组，使它们之间进行优势互补。

③在亲本选配中，一般多以具有最多优良性状的品种作母本，具有需要改良性状的品种作父本。在许多情况下，母本对后代有较强的影响，后代出现综合性状优良的变异类型也多。如选育目标是提高优质品种的抗病性，抗病性是我们需要改良的性状。在亲本选配中则应以综合性状的优良而又突出优质的品种，如湖州黄叶、嘉善四月蔓等板叶型为母本，以抗病的品种如浦江细叶九头芥、邱隘黄花叶为父本。

④选配本地和异地的优良品种为杂交亲本。本地优良品种对本地条件具有良好的适应性，其产品也符合本地群众要求，用它作为亲本之一，再用地理上相距较远的外地优良品种作为另一亲本。一般说来，其杂种一代会表现出性状优良的变异，既具有较强的适应性，也会有显著的产量优势。

雪菜的育种工作目标，应根据当地生产和消费两方面的要求来确定。要突出解决当地该品种存在的主要问题，以便选育出抗病丰产优质，并有不同生育期适宜春秋两季栽培不同特点的杂种一代。为便于选择，应多选些亲本，多选配一些组合，可增加提

供符合选育目标要求的变异类型的机会。至于组合究竟组配多少，要根据原始材料多少而定。但在所搜集的原始材料中，有时某些品种十分混杂，必须首先将这些品种提纯，才能参与组合力选配。组合力选配时，每一杂交组合的花朵数一般不宜少于 40 ~ 50 朵花。

（2）组合力测定。

按照组合选配的原则选配组合，并不能完全判断杂种优势的强弱，必须通过实践的测验，才能掌握亲本间的组合力。组合力又叫配合力，主要表现在产量上、抗病性和其他经济性状上。组合力的测定分一般组合力测定和特殊组合力测定两种。

①一般组合力测定。就是以某一个品种或自交系作为测定对象，将它与初步选出的各品种或各自交系分别进行杂交，来比较其产生的杂交优势，从中选出组合力高的品种或自交系作为杂交亲本。在实践中，常以当地某优良品种作为测交者，为改善该品种的某些缺陷，与其他品种或自交系配对，以筛选出优良的杂交组合。因此，这种方法比较简单，在育种中经常采用这种方法。

②特殊组合力的测定。用选出的各个品种或自交系分别两两配对进行杂交，并比较每一个组合的生产力，从中选出最优良的组合。这种测定，工作量大，常在一般组合力测定之后，或品种、自交系较少时采用这种方法。

经过组合力测定，选出优良杂交组合后，下一步工作就是对配制的一代杂交种子进行严格的生产鉴定和区域试验，进一步观察该杂种一代的产量、品质、抗性及生育期等，以确定该杂交一代的推广价值与适宜的推广地区及栽培季节，并提出相应的栽培措施和制种技术要点等。

4. 自交不亲和系的繁殖和杂交制种

（1）自交不亲和系的繁殖。

利用自交不亲和系配制一代杂种，需要解决作为亲本的自交不亲和系的繁殖问题。自交不亲和系的原种要在严格的隔离条件下用人工蕾期授粉的方法繁殖，一般多在 10 月上中旬播种育苗，

11月中、下旬移栽，翌年开春后实施隔离，进行人工蕾期授粉。但由于自交不亲和系是经多代自交育成的，抗逆性较差，应注意加强管理。繁殖自交不亲和系的种株最好在塑料拱棚内栽培，要用纱罩隔离，防止昆虫授粉。授粉期间，白天温度不高于30℃，夜间温度10℃左右，相对湿度60%左右为宜。授粉时要选开花前2～4d的花蕾，用小镊子将花蕾轻轻拨开，使之露出柱头，然后取同系的新鲜花粉授粉，也可用洁净的毛笔，沾上同系已开花的花上的花粉，往花蕾的柱头上涂抹，种株结荚成熟后分期收获。各个自交不亲和系的种子一定要分收，严防机械混杂。

蕾期授粉比花期授粉费工，这不仅使种子生产成本增加，而且由于连续自交造成的生活力退化比一般自交系严重。为此蕾期授粉要注意以下几点：

①选用蕾期结实率较高的自交不亲和系。

②鉴于蕾龄不同，结实效果不一（将要开花的大花蕾和太小的花蕾结实效果都不好），为提高结实率，应选开花前2～4d的花蕾授粉。

③为避免自交代数过多而产生生活力过度衰退，已稳定的自交不亲和系，可采用同系内的混合花粉授粉，或一年集中繁殖大量亲本种子，贮藏起来，逐年使用，以减少自交繁殖代数。

对配制单交种的亲本自交不亲和系的繁殖，可以采用青岛市农科所的隔离区小株自然授粉繁殖法。同时，为确保获得一定的种子量，应当比蕾期授粉再多栽一些亲本植株。但由于连续进行花期自然授粉传代，可能会使花期自交亲和性逐渐提高，因此，需要每隔2、3代调查一次系内花期自然授粉结实指数，以便及时发现该系统的自交不亲和性有否发生变异。

（2）自交不亲和系的杂交制种。

亲本的组配方式。用自交不亲和系制种，通常有不亲和系×亲和系、不亲和系×不亲和系、（不亲和系×不亲和系）×亲和系、（不亲和系×不亲和系）×不亲和系、（不亲和系×不亲和系）×（不亲和系×不亲和系）等亲本配组方式。

两种单交方式相比，“不亲和系×亲和系”的优点是只需要选育一种基因型的自交不亲和系，而且可从大量的亲和系中选取经济性状和配合力最好的系统作为父本，从而使整个育种过程变得更为简单，较易育成优良组合。缺点是从亲和系植株上收获的种子内，真正的杂种率较低，往往不能用于生产。“不亲和系×不亲和系”需要选育两种不同基因型的自交不亲和系才能保证系间交配亲和。采用这种制种法，为了获得优良杂交组合，需要育成许多自交不亲和系，因而选育较为费事。但制种所得的正反交种子的杂种率都较高。如果正反交后代的经济经济性状和配合力相似，可采取 1∶1 或 2∶2 配植法，全部种子都可用于生产。

三系交和双交制的优点是可以大大节省亲本保存繁殖自交不亲和系所需的人力和物力，降低种子生产成本。缺点是需要 3、4 种基因型不同的自交不亲和系，选育工作更复杂费事。一代杂种的一致性较差，制种时每年需要较多的隔离采种圃。配制双交种，不仅应该用正反交都亲和的单元组合，并且一般都是正反交种子都能用的。所以单交系采种圃和双交种采种圃都应该采用 1∶1 隔行栽植法。

（3）应用自交不亲和系制种的特点。

①不同的自交不亲和系间有时也存在着不同程度的不亲和性，所以制种时必须选择系内高度不亲和而系统间异交高度亲和的系统，以提高 F1 代的种子产量。

②在隔离地块，两亲本与其他品种要隔行种植，自由杂交制种。如果两个亲本都是自交不亲和系，则可同时产生正反交的 F1 代种子，如果正反交后代的经济性状相似，全部种子都可用于生产。如果一个亲本是自交不亲和系甲，另一个是自交系（或品种）乙，则只能从甲上可收到 F1 代杂交种子。为提高 F1 代种子产量，甲、乙可按 3∶1 或 4∶1 隔行种植。

③因为自交不亲和系的不亲和性不是绝对的，会发生少量系内株间授粉，产生少量非杂交种子，应在间苗定植时，根据苗期标志性状，淘汰伪杂株。

④利用自交不亲和系配制一代杂种，常常会因父母本花期不遇而影响制种效果。为了解决这个问题，可采用错开亲本播种期和种株定植时间、对开花早的亲本进行花序扎心、通过肥水管理、调节亲本花期等方法。

（二）实践案例

宁波市鄞州区雪菜开发研究中心从 2001 年开始，从雪菜的三大类型（即板叶型、细叶型、花叶型）68 个品种中先后选择了 29 个品种、122 株单株进行花期套袋，培育自交不亲和株并对其进行经济性状、抗性、品质等指标测定。在此基础上，于 2002 年春，选择了 11 个品种、22 个株系中不亲和系数达到自交不育指标的 150 多个单株，于 2002 年秋季开始进行品种间杂交试配，选择了 56 个较有希望的杂交组合。2003 年秋，该中心又对当年试配的 195 个杂交组合，进行了初选的杂种一代的经济性状与抗性（重点是观察对雪菜病毒病的抗性）鉴定。经大田试种、观察对比表明：

①试配的 195 个杂交组合均比常规品种有较强的生长优势，但不同配组之间，正交与负交之间差异较大。

②试配的 195 个杂交组合多数都对雪菜病毒病具有较强的抗性，但不同配组之间，正交与负交之间差异较大。

③试配的 195 个杂交组合多数产量都较高，但不同配组之间，正交与负交之间差异较大。

④形态性状变异明显，凡板叶种与细叶种杂交，后代都是花叶种，未见板叶后代产生；凡细叶种与花叶种杂交，后代都是细叶种或近于细叶的花叶种；花叶与板叶杂交的后代都是花叶。只有板叶与板叶杂交才产生板叶后代。

杂交组合有应用前景，但由于试验经费及各种原因的限制，杂交育种未能持续，也未在生产上得到实际应用。

第七章　综合防治雪菜病毒病的其他措施

第一节　切断传毒媒介

植物病毒不像其他真菌性那样可以采用化学保护的措施，即使可以利用，范围也极有限，因为病毒如果是系统性侵染，则一旦侵入寄主后，便会蔓延到全体，在体外施用化学保护药剂，没有作用。由于这个特点，切断传毒媒介经常成为防治雪菜病毒病的最积极的措施之一。

雪菜病毒病的病毒主要是芜菁花叶病毒，其传毒媒介一是易感受芜菁花叶病毒的萝卜、小白菜、芜青、油菜、甘蓝、榨菜等蔬菜作物和十字花科杂草；二是蚜虫。

（一）消除杂草寄主和桥梁寄主

芜菁花叶病毒寄主较多，地头的十字花科杂草，特别是多年生的十字花科杂草和萝卜、小白菜、芜青、油菜、甘蓝、榨菜等蔬菜经常带有病毒，是雪菜病毒病的致病源。因此必须采取以下措施：

①刈除地头杂草，至少要尽量地做到在苗床周围的一定距离内没有杂草；

②重视轮作，避免在种过十字花科蔬菜的田地里种植雪菜，并合理安排各种蔬菜作物栽种的制度。经验证明，凡是先栽甘蓝及早萝卜的菜田附近种秋雪菜往往易发生病毒病，而且发病早且重；而雪菜和甘蓝或萝卜同时栽植或间作，情况就不一样，发病就要轻得多，其原因是雪菜和甘蓝或萝卜同时播种或栽植，得病的机会是匀等的，甘蓝和萝卜失去了它们作为一个桥梁的作用。

（二）应用防虫覆盖育苗，切断传毒媒介

慈溪农业局陈庭华（2000）提出应用防虫覆盖育苗是切断传毒媒介、预防病毒病的关键技术。经不同目数、不同颜色的防虫网覆盖育苗试验和示范均取得较好的防病效果，防效达 51.2% ~ 73.3%，增产效果显著，还能同时具有控制苗期其他虫害，减轻软腐病等多种功能。周书军、唐爱章、叶培根等于 2003 年 10 月 13 日雪菜播种至 2004 年 4 月 6 日雪菜收获期间，在宁波市鄞州区邱隘镇邱一村精农园区进行了防虫网育苗分期移栽与病毒病发生的关系与对产量的影响试验。

试验应用防虫网全程封闭育苗。分 25/11、2/12、9/12 三期移栽处理，以三期露地育苗作对照。各设 3 次重复。小区面积 17.5m^2，种植 104 株雪菜。参试品种为易感病的本地黄叶种。肥水管理同常规大地。栽后到收获，全过程观察病毒病发病消长，收获前调查发病率及病情损失率，并折算产量。病情指数按李树德等（1995）和曹寿椿（1990）方法计算：

0 级：无症；

1 级：心叶明脉，轻微花叶；

3 级：心叶及中部叶片花叶；

5 级：心叶及中、外叶片花叶（半数以上外叶），少数病叶畸型、皱缩和植株轻度矮化；

7 级：重花叶，多数病叶畸形皱缩，球叶坏死斑点及叶脉轻度坏死，植株矮化；

9 级：严重花叶和皱缩，叶脉坏死至整株坏死，无商品价值。

病情指数 = Σ（病级株数乘以病级级数）÷（调查株数乘以最高病级数）×100

试验结果见表 7－1、表 7－2。

表 7-1　防虫网全程封闭育苗对病毒病株发病率、病情指数的影响

栽期处理	见病小区		株发病率（%）	病情指数
	日期	病株		
25/11	31/1	40	12.82	11.89
对照	25/12	51	16.35	15.51
02/12	31/01	27	8.65	7.34
对照	14/01	34	10.89	9.23
09/12	11/02	10	3.22	1.85
对照	10/02	18	5.76	4.12

表 7-2　防虫网全程封闭育苗对产量的影响　（单位：kg）

移栽日期	小区产量			小区产量总和	小区均产	折亩产量
	1	2	3			
25/11	124	122	125	371	123.7	3 711
对照	116	113	121	350	116.6	3 498
02/12	127	127	133	387	129	3 870
对照	122	120	123	365	121.6	3 649
09/12	118	116	117	351	117	3 510
对照	114	110	112	336	112	3 360

试验结果表明，防虫网育苗和露地育苗比较有两点区别：一是随着移栽推迟，地间始见病株推迟，收获时病情损失率降低；二是防虫网育苗的各期处理均比露地育苗各期处理地间始见病株迟，病情及其损失率也相对较轻。

从产量来看，防虫网育苗的各期处理的产量均高于露地育苗的各期处理。其中防虫网育苗 02/12 移栽，产量最高，比 25/11 移栽亩产高 159kg，比 09/12 移栽亩产高 360kg，分别高 4.28% 和 10.2%；防虫网育苗的各期处理的产量与露地育苗各期处理相比，其产量差异均呈显著水平。

防虫网是以高密度聚乙烯为主要原料并添加抗紫外线、防老化等助剂，经挤出拉丝编织而成的 18～50 目（每英寸长度的孔

数）等规格的网纱。具有耐拉强度大，抗热性、耐水性、耐腐蚀、耐老化、抗紫外线、无毒、无味，废弃物易处理等特点。

在使用防虫网中应注意掌握以下技术要点：

（1）选择合理的使用期。雪菜病毒病的感染主要在苗期与生长前期，因此防虫网在使用时间应该选在冬菜与秋菜的育苗期，在苗期覆盖。

（2）选择合理的密度规格。防虫网的密度规格就是目数，是指在一英寸见方内（长25.4mm，宽25.4mm）有经纱和纬纱的根数，如在一英寸见方内（25.4mn，宽25.4mn）有经纱20根，纬纱20根，即为20目。一般是18～50目，主要使用的范围是20～32目，丝径0.18mm，幅宽1.2～3.6m，白色。宁波市江北区试验以顶部采用大棚防雨膜，裙边用22目左右的银灰色防虫网的覆盖方式较为实用。目数过大，起不到应有的防虫效果。

（3）防虫网的色泽以选用黑色防虫网或银灰色的防虫网效果更好。

（4）因地、因时制宜，选择合理的覆盖模式。防虫网的覆盖模式主要有：

①浮面覆盖：又称直接覆盖、飘浮覆盖或畦面覆盖。即在夏秋雪菜播种或定植后，把防虫网直接覆盖在畦面或作物上，待齐苗或定植苗移栽成活后即揭除。如防虫网内增覆地膜，同时防虫网上面还增覆两面层遮阳网，其防虫抵御突发性自然灾害的效果更佳。

②矮平棚覆盖：棚架高度一般为80～100cm。多用架竹搭建，操作方便，高低可以调节。如遇台风暴雨可临时降低到20～30cm，以增强抗台风能力。防虫网覆盖棚架，且应全封闭式覆盖。

③小拱棚覆盖：是目前长江中下游地区较为普遍的一种覆盖形式。小拱棚的宽度、高度依作物种类、畦的大小而异。通常棚宽不超过2m，棚高为40～60cm，防虫网覆盖拱架上，可采用全封闭的覆盖方式。

④大棚覆盖：即利用已有的大棚并覆盖防虫网，是不少地区进行夏秋雪菜栽培或育苗的主要形式。通常由跨度6m，高2.5m的镀锌钢管构成。实行防虫网全封闭覆盖，但在高温时段两侧可揭除，有利通风降温。如用防虫网与塑料薄膜配套使用，不仅具有很好的防虫效果，而且还增加了抵御自然灾害的能力。

防虫网的使用寿命因使用方法与清洁保养程度而异，提高防虫网的使用寿命可从两方面着手：

①提高年覆盖茬次。

②提高总覆盖茬次并使用和贮藏的全过程中要避免机械损伤，使用中不得用污水浇泼，要经常保持防虫网的清洁，使用结束后，要及时洗净、晾干、卷好贮存。

实践证明，如使用得法，防虫网可连续使用5年，甚至可望达到7年。

第二节　适当推迟播期，避开蚜虫危害高峰

蚜虫种类很多，有107属2 280种，分布遍及世界各地。中国已知260种，分布遍及全国各地。其中小蚜属、黑背蚜属及否蚜属为中国特有属。危害雪菜的蚜虫主要有菜缢管蚜和桃蚜。蚜虫的繁殖力很强，蚜虫不需要雄性就可以怀孕，年能繁殖10～30个世代，世代重叠现象突出。当5d的平均气温稳定上升到12℃以上时，便开始繁殖。在气温较低的早春和晚秋，完成1个世代需10d，在夏季温暖条件下，只需4～5d。它以卵在桃树等枝条上越冬，也可保护地内以成虫越冬。气温为16～22℃时最适宜蚜虫繁育，干旱或植株密度过大有利于蚜虫为害。避免与减轻蚜虫危害是控制雪菜病毒病的主要措施之一。周书军、唐爱章、叶培根等于2003年冬季至2004年春季进行了不同播种期与病毒病发生关系的试验。

试验分10月13日、18日、23日3期播种，11月25日移栽。每期播种处理，随机排列，设3次重复，9个小区。每小区

面积17.5m²，种植104株雪菜；参试品种为易感病的本地传统黄叶种；栽培管理条件同常规大地。从播种开始，观察记载病毒病发病变化，收获前调查病毒病发病率及损失率，折算产量。病情指数按李树德等（1995）和曹寿椿（1990）方法计算：

0级：无症；

1级：心叶明脉，轻微花叶；

3级：心叶及中部叶片花叶；

5级：心叶及中、外叶片花叶（半数以上外叶），少数病叶畸形、皱缩和植株轻度矮化；

7级：重花叶，多数病叶畸形皱缩，球叶坏死斑点及叶脉轻度坏死，植株矮化；

9级：严重花叶和皱缩，叶脉坏死至整株坏死，无商品价值。

病情指数＝∑（病级株数乘以病级级数）÷（调查株数乘以最高病级数）×100

试验结果见表7－3、表7－4。

表7－3 不同播期对雪菜病毒病发病的影响

播种日期	始见日期	收获时病株数	株发病率（%）	病情指数
13/10	25/12	56	17.95	17.3
18/10	14/01	34	10.89	9.22
23/10	20/01	28	8.97	7.69

表7－4 不同播期对雪菜产量的影响

播种日期	采收期	小区产量			小区产量总和	小区均产	折亩产量（kg）	因病减产	
		1	2	3				kg/亩	%
13/10	(2004) 6/4	116	113	120	349	116.3	3 489	－381	9.84
18/10		128	128	127	383	127.7	3 831	－39	1.01
23/10		131	131	125	387	129	3 870	—	—

重复小区产量总和T＝375＋372＋372＝1 119

试验结果表明，早播（13/10）的病情最重，株发病率高

(17.95%)，产量损失最大（-381kg），随着播种（23/10）推迟，病情减轻，株发病率低（8.97%），因此其产量损失也随之减轻。经方差分析及显著性测验，第一期播种与后二期播种相比，减产呈显著水平。

第三节　改进栽培管理，改善生态环境

一、选择合理的播种方式

周雪平、施曼玲的研究表明，雪菜病毒病是由蚜虫为介体而传播的，并造成病害成灾流行，然而在生产中常有蚜虫轻发年份照样发生病毒病流行现象。为弄清除蚜虫传播，是否还存在其他传播途径，周书军、唐爱章、叶培根等于2003年秋季进行了雪菜不同播种方式与病毒病发生关系的试验。

试验地点安排在鄞州区邱隘镇邱一村精农示范园。试验设直播、带土移栽、常规移栽3个处理，随机排列，3次重复。每小区面积20.6m^2。参试品种为本地易感病的黄叶种。每小区栽152株。直播时间为9月1日（不移栽）另外两处理播期8月26日，移栽期为9月24日。田间肥水管理相同，移栽前3个处理的秧苗均未见病毒病。移栽后每隔5d调查记载1次病毒病消长情况。收获时折算产量。统计发病率及病情指数。

试验结果见表7-5、表7-6。

表7-5　不同播种方式对发病率的影响

日期	4/10	9/10	14/10	20/10	26/10	31/10	5/11	11/11	16/11	21/11
处理1	1	1	1	1	2	2	2	2	4	9
处理2	1	1	1	2	3	5	6	6	9	14
处理3	1	1	1	2	7	7	15	21	32	49

*说明：(1) 每个处理为1小区，处理1为直播，处理2为带土移栽，处理3为常规移栽（对照）。每个小区考查152株，3个处理共考查456株。

(2) 表中的数字为考查结果（发病株数）。

考查结果表明：秧苗期未见病，栽后10d，3个处理均见病。10月26日后，处理1发病仍较轻，而处理2、3病情开始加重，尤其是处理3病情加重较快。到收获时，3个处理的株发病率分别为1.97%、3.07%和10.75%。病情指数［李树德等（1995）和曹寿椿等（1990）方法计算］分别为7.14、1.36和0.61。处理1发病轻于处理2，轻于处理3。

表7－6 不同播种方式对产量的影响 （单位：kg）

处理	小区产量			小区产量合计	小区均产	折亩产量	因病减产		位次
	1	2	3				增减产	增减%	
1	166.6	162.9	164.5	494	164.6	5 312	+481	9.95	1
2	159.8	157	160.2	477	159	5 129	+298	6.16	2
3	147	151.9	150.4	449.3	149.8	4 831	—	－3	
合计	473.4	471.8	475.1	1 420.3					

试验结果表明：直播、带土移栽与常规移栽相比，增产呈极显著和显著水平。

应用直播的方法可以减轻病毒病的发生危害，其原因是：雪菜直播从播种到收获，植株根、茎一直未受损伤，而常规移栽，在移栽过程中根断茎伤，秧苗植株造成许多伤口，移栽后病毒易通过伤口进入植株而感病。

由此也可以得出结论：雪菜病毒的传播除蚜虫传播危害外，通过土壤中的线虫等生物为介体从根部伤口侵入，也是一个传播途径。

二、培育壮苗，严把定植关

要把好种子质量关，选用无病菜地上的健株留种；育苗时应选用地势高、排水好、土质松、未种植雪菜的田块作苗床并对苗床进行消毒，施用腐熟的有机肥，防止病菌侵染；适时播种，并采用防虫网或温室育苗，做好苗期防蚜虫措施，并加强温、湿度管理，严防幼苗疯长，培育壮苗，提高幼苗的抗逆性，移栽时，

凡感染病毒的苗子一律淘汰，以免定植成为病毒病的传播源。培育无病虫健壮苗。

三、选择合理的栽种密度

栽种密度过大，通风透光差，容易诱发病毒病。因此必须选择合理的栽种密度。雪菜的栽种密度，应根据品种、气候等因素合理确定，细叶种可比板叶种适当宽一点，宁波地区一般以40cm×40cm为宜；板叶品种如上海加长种，鄞雪18号在嘉兴地区行距×株距可为30cm×（25~28）cm，亩栽7 500~8 000株；在宁波邱隘，则因气温较高，可略稀一些，以35cm×30cm为宜，亩栽6 000株左右。如栽金丝菜，在同一地区都应比栽上海加长种，鄞雪18号密一些。

四、加强水、肥管理

周书军等人的试验研究与实践证明，加强肥水管理，改善生态环境需注意以下几点：

（1）提倡潮地移栽。

潮地移栽不易诱发病毒病，一般认为，移栽时的土壤持水量以45%左右为宜。

（2）栽种以后要加强水、肥管理。

水的管理上要做到看天、看地、看苗进行合理浇水，积极推广滴灌、暗灌、渗灌等节水技术。防止漫灌，既要深沟高畦，防止渍水，避免田间湿度偏大，又要注意在高温季节应多浇水，以降低地温，避免缺水脱肥早衰，减弱抗病能力。对感受病毒病的植株，应增加其周围环境的湿度，促使病情得到缓解甚至消失。肥的管理，一是要合理施肥，要根据土壤肥力特点，开展平衡施肥，优化配方施肥技术，要以充分腐熟的有机肥作基肥，配施适量的氮磷钾肥和微量营养元素，前、中、后期肥料总量要控制在一定比例。使用方法要合理，用量要适当，过多、过少都会使菜株生长发育不正常，直接或间接诱发病害。实践证明，氮肥过多

容易使菜株生长徒长，组织幼嫩，抗病能力减弱，特别对病毒病，具有加剧其严重程度的趋向。增施钾、磷肥，有利菜株的机械组织形成，提高抗病能力。二是施用有机肥料必须充分腐熟，因为未腐熟的有机肥料中，不仅蕴藏着大量病菌，而且施用这种肥料，就等于把病菌施入地里，还会伤根，便于病菌侵入。

五、合理轮作

合理轮作不仅能提高作物本身的抗逆能力，而且能够使潜藏在地里的病原物经过一定期限后大量减少或丧失侵染能力。轮作方式一般有两类：一是不同蔬菜之间轮作；二是雪菜与粮食作物之间轮作，如雪菜与水稻之间的水、旱轮作，效果就比较好。对没有条件实行轮作的地块，可以利用在夏季换茬间隙，深耕后灌水 3d，然后再排水整地作畦，这也是一种简单、有效杀死病毒介体的有效方法。

六、清洁环境

栽培过程中要及时摘除病枝、残叶、病果、虫株残体，拔除中心病株。一季蔬菜收获后，要及时清除废弃地膜、秸秆、病株、残叶，防止病源依附在作物残枝上散落田间，进入土壤后，成为后茬雪菜的浸染源。对病田用过的农机具、工具、架材也要进行彻底消毒。

七、秋耕冬灌

秋耕是通过翻耕借助自然条件，如低温、太阳紫外线等，杀死部分土传病毒，冬灌可以冷冻杀死越冬虫源。

第四节　采用积极的、物理的及化学的防治方法

物理的及化学的防治方法其目的都是通过治蚜防病，主要措施如下：

一、在大田中设立障栅或诱杀作物

蚜虫从另一个地区迁入雪菜田的途径一般都是从边沿开始的，因此从大田边沿种植一个诱杀作物带能起阻止昆虫内迁的作用。这种作物应是迁来的蚜虫特别喜爱的，蚜虫集中在这个作物带内，不向内迁，这样人们就可以集中力量在这个诱杀带内消灭飞来的蚜虫。

二、利用银色反光箔或板放置在田间驱蚜

试验证明，这种方法对蚜传病毒十分有效，能够有效地通过驱蚜而达到防治雪菜病毒病的目的。将银色反光箔或板改成银色塑料网条，架在苗畦上，同样能收到良好的效果。

三、及时使用低毒、低残留农药防治

发现病株后可用镇蚜 1 500 倍液及时控制或用吡虫啉防治蚜虫，吡虫啉又名一遍净、蚜虱净、大功臣、康复多、必林等，是烟碱类超高效杀虫剂，具有广谱、高效、低毒、低残留，害虫不易产生抗性，对人、畜、植物和天敌安全等特点，并有触杀、胃毒和内吸等多重作用。害虫接触药剂后，中枢神经正常传导受阻，使其麻痹死亡。产品速效性好，药后 1d 即有较高的防效，残留期长达 25d 左右。药效和温度呈正相关，温度高，杀虫效果好。主要用于防治刺吸式口器害虫，如绣线菊蚜、苹果瘤蚜、桃蚜、梨木虱、卷叶蛾、粉虱、斑潜蝇等。一般可用 10% 吡虫啉 4 000 ~6 000 倍液喷雾，或用5% 吡虫啉乳油 2 000 ~3 000 倍液喷雾防治。对已感染病毒病的雪菜可用 3. 95% 病毒必克可湿粉剂 600 ~700 倍液；20% 病毒 A 可湿性粉剂 400 ~600 倍液；24% 毒消水剂 1 000 ~1 500 倍液；2% 菌克毒克水剂 500 ~1 000 倍液；1. 5% 植病灵 1 000 倍液防治。7 ~10d 1 次，连续 2 ~3 次。或用病毒 K（抗病威）、病毒杀星、高锰酸钾等防治，防治中要注意轮换用药。试验证明，用高锰酸钾防治植物病毒病的效果显著；

优于病毒 A，菌毒清等农药。在发病初期用高锰酸钾 600 ~ 800 倍液，对全株进行喷雾，5 ~ 7d 1 次，连喷 3 ~ 4 次可有效防治病毒病。若用高锰酸钾与双效助壮素病毒 K 等量 800 ~ 1 000 倍液混用，防治效果更好。但应注意在防治前，须对植株上的刺吸式害虫进行防治，以防传毒。

四、开发植物源抗毒活性物质防治病毒

防治植物病毒病的新方法是植物源抗毒活性物质和生物源抗逆调控物质的优化组合。植物源抗毒活性物质是由西北农林科技大学吴云锋博士在国家“九五”、“十五”攻关计划、陕西省科技攻关计划、陕西省自然科学基金项目的支持下，历时 18 年，筛选分析了 530 余种生物材料，在国内外，首次分离、发现了多种具有抗植物病毒活性功能的化合物，在生物学、病生理学、超微结构等水平首次探明了多羟基双萘醛的防治植物病毒病的机理。防治原理是喷施在植物叶片后即能够直接抑制病毒复制，阻止病毒侵染，使该化合物具有治疗作用与预防作用。

五、利用诱抗素防治病毒

诱抗素是中国科学院的“国家 863 计划”和“国家九五重点科技攻关项目”高科技成果。它是一种具有重要生理活性的植物内源生长调节物质，被称为“植物抗逆诱导最重要的物质”。抗逆理论的最新发展和现代抗性分子生物学的研究表明，诱抗素依赖的抗性基因激活途径是植物抗性的主要表达形式，是植物抗逆调节的最核心物质。例如，绝大多数的逆境都可以诱导植物体内的诱抗素水平的升高从而诱导绝大多数的逆境适应蛋白的表达，特别是在调节植物对水分逆境的抗性上具有无可替代的功能。诱抗素诱导产生的渗透素可以破坏病菌菌丝体的细胞膜透性，抑制病原菌的生长和侵入，在植物的抗病过程中也起到重要的作用。对植物施用外源诱抗素可以打开植物本身的抗性，强化植物自身的活力，全面改善植物对不良土壤和气候环境的适应性，维持健

全的生长发育状态，避免病原物的侵染，对提高植物产量和品质具有重要意义。

六、色胶板诱集

色胶板诱集是一种非化学防治措施，它利用害虫特殊的光谱反应原理和光色生态规律，从作物苗期和定植开始，在害虫可能暴发的时间持续不间断地诱杀害虫，既能及时监测田间害虫数量变动，又可避免和减少使用杀虫剂，对环境安全，并有利于害虫的天敌生长。

目前，广泛应用的有黄色粘胶板和蓝色粘胶板，将黄板或蓝板涂上机油（或凡士林等），置于高出植株30cm处，诱杀蚜虫要用黄板，据研究，不同周长的黄板诱杀的效果不一样，诱集量多集中在粘胶板的边缘，板的中间较少，因此如同样面积，以将粘胶板做成长条状的诱虫效果较好。

七、积极采用生物防治

例如瓢虫、草蛉、食蚜蝇等可防治蚜虫，生产上应因地制宜加以保护和利用。保护的措施一是创造有利于天敌生长繁育的生态环境；二是在周边农田的用药上应利用生物源、植物源农药，减轻对天敌的影响。目前开发的生物源农药，细菌杀虫剂有苏云金杆菌（Bt），苏特灵、千胜等；真菌杀虫剂有白僵菌、绿僵菌、虫霉等；病毒杀虫剂有核型多角体病毒、质型多角体病毒、奥绿一号（NPV），甜菜夜蛾核多角体病毒、小菜蛾颗粒体病毒、生物复合病毒杀虫剂等；农用抗菌素有阿维菌素（Abamectin）、依维菌素（Ivermectin）、农用链霉素、新植霉素、菜喜（多杀菌素）、浏阳霉素等；植物源农药有苦参碱、苦楝素、烟碱、茴蒿素、鱼藤酮、藜芦碱、除虫菊等。

第五节　应用雪菜抗病毒基因工程

每年，全世界农作物因病害损失的产量约为总量的10%，经济损失高达500亿美元，其中病毒病害尤其严重，因为它没有根本性的防治方法。传统的抗病育种、农药防治、合理的栽培措施以及组织脱毒，不仅耗时、耗力，污染环境，而且效果不理想。1986年，植物抗病毒基因工程的诞生，为防治植物病毒病害提供了新策略。十年来，植物抗病毒基因工程取得了很大的进展，产生了一些新方法。

一、利用病毒外壳蛋白基因

1986年，Beachy等首次把烟草花叶病毒（TMV）*CP*（coat protein）基因转入烟草，转基因植株及后代对TMV表现明显抗性。从TMV－*CP*基因转化烟草成功以来，迄今为止，已有15个植物病毒属中的30多种病毒的*CP*基因在烟草、番茄、马铃薯、番木瓜、甜菜、大豆、柑橘、辣椒和水稻等多种作物中表达。这些转基因植株，对相关病毒的侵染都表现了一定的抗性，CP介导的抗性适用于单链和双链RNA病毒。此外，也适用于属于单链DNA病毒的番茄黄色卷叶病毒（TYLCV）。

目前，人们对*CP*基因工程植物的抗性表现机理还不太清楚，普遍的观点是：存在于植物体内少量外壳蛋白，可以阻断攻毒病毒最初入侵植物细胞；或侵入后，抑制其脱壳；或脱壳后，核酸马上又被外壳蛋白包被，干扰了第2种病毒的复制。此外，外壳蛋白还能降低病毒在植物体内的传递速度。

外壳蛋白基因工程植物对病毒的抗性有几个引人注目的特点：

1. 抗性与外壳蛋白表达量的关系

通常两者密切相关，往往成正比关系，外壳蛋白表达量最高的植株常常抗性最强，如马铃薯X病毒（PVX）*CP*基因的工程

植株，它的抗性随外壳蛋白的浓度增加而加强。但有些报道表明抗性与 *CP* 表达量无关，如转黄瓜花叶病毒 U1 株系（CMV - U1）*CP* 基因的烟草，表现最强抗性的植株 *CP* 表达量仅为细胞可溶性蛋白的 0.153% 和 0.113%，而 *CP* 表达量高达 0.3% ~0.7% 的植株抗性并不强。大豆花叶病毒（SMV）、番茄斑萎病毒（TSWV）、马铃薯 Y 病毒（PVY）等 *CP* 基因的工程植株，也有类似的抗性与 *CP* 表达量无关的报道。人们经过研究发现转化烟草蚀纹病毒（TEV）和马铃薯 Y 病毒（PVY）等病毒的 *CP* 基因的植株所表现的抗性是 RNA 介导的，抗性表现并不需要 *CP* 基因的表达，其机制可能是转录后基因沉默。由此可见，*CP* 表达量并不是抗性强弱的唯一制约因素，外壳蛋白在植物细胞内表达所在的位置似乎比 *CP* 表达量更为重要。若把 *CP* 基因转入与病毒复制和扩散相关的植物特殊组织、细胞或亚细胞中，则有可能提高抗性。

2. 抗性与病毒接种浓度的关系

一些转 *CP* 基因的植物，抗性强弱与病毒的浓度无关，如转黄瓜花叶病毒（CMV）*CP* 基因的烟草对 CMV 的抗性，以及转番木瓜环斑病毒（PRV）*CP* 基因的烟草对烟草蚀纹病毒（TEV）的抗性。但对于转烟草花叶病毒（TMV）*CP* 基因的烟草，若降低 TMV 接种浓度，则能延迟其发病时间，转苜蓿花叶病毒（ALMV）*CP* 基因的烟草也如此。

3. 抗性与病毒接种方式的关系

CP 基因的工程植株对机械接种的病毒几乎都表现抗性：从减轻症状，推迟发病到完全抑制侵染的“免疫”。一些转基因植株还能抵抗蚜传的病毒，如转 PVY - *CP* 基因和转马铃薯卷叶黄症病毒（PLRV）*CP* 基因的烟草。

4. 抗性与攻毒病毒有无外壳的关系

一般用病毒 RNA，或经 pH8.0 缓冲液处理已部分或全部脱壳的病毒代替完整病毒粒子接种，抗性将减弱。如转 TMV - *CP* 基因、CMV - *CP* 基因和 ALMV - *CP* 基因的烟草等。但转 PVX - *CP* 基因的烟草例外，它对病毒粒子和 RNA 均有很强抗性。

5. 抗性与 *CP* RNA 取向的关系

正向 *CP* RNA 转化的植物，能在体内产生外壳蛋白，对高浓度病毒侵染表现较强抗性。反义 *CP* RNA 转化的植物，不能产生外壳蛋白，对病毒侵染仅有轻微保护作用，只能经受低浓度病毒的接种，如转 PVX - *CP* 和转 CMV - *CP* 基因的烟草等。

6. 抗性的范围

许多实验表明，*CP* 基因工程植物对病毒的抗性常具有特异性，往往只针对某种病毒，甚至株系，才表现较强抗性。但对不同病毒组或同组不同成员以及不同株系的病毒也常表现一定的抗性，如转 TMV - *CP* 基因的烟草，对不同组的 CMV 侵染表现较弱但明显的抗性；转 PRV - *CP* 基因的烟草，能减轻由同组其他成员如 TEV、PVY、甜椒斑驳病毒（PeMV）的侵染引起的症状，但对异组 CMV 侵染毫无抗性。Nejidat 等认为，转 *CP* 基因的工程植株对不同病毒的抗性差异是与外壳蛋白氨基酸序列同源性大小有关。Nejidat 和 Beachy 提出外壳蛋白氨基酸 60% 的同源性可能是抗性强弱的界限。他们的实验表明转 CMV - *CP* 基因的烟草对同一病毒组其他成员的抗性，其中最高是对氨基酸序列同源 82% 和 72% 的番茄花叶病毒（ToMV）和烟草轻绿花叶病毒（TMGMV）。对同源 60% 的齿兰环斑病毒（ORV）抗性略弱，而对同源 45% 的长叶车前花叶病毒（RMV）几乎无抗性。另一些实验也证实了 Nejidat 和 Beachy 的观点，如转烟草脆裂病毒（TRV）TCM 株系 *CP* 基因的烟草，对 TCM 株系病毒侵染表现很强抗性，而对同源 39% 的另一株系 PLB 根本无抗性。转大豆花叶病毒（SMV）*CP* 基因的烟草对同组同源 61% 和 58% 的 TEV 和 PVY 表现很强抗性，而根本不抗不同组的 TMV。总的来说，这些转 *CP* 基因的工程植株的抗病性有一定局限性，若把两种或多种病毒 *CP* 基因转入同一植株，则植物的抗病性有望增强，可使大田中作物抵御多种病毒的混合侵染。1990 年 Lawson 将马铃薯 X 和 Y 病毒的 *CP* 基因转入马铃薯，得到双抗性的工程植株。这种复合基因策略，也是植物抗病毒基因工程的一个新方向。

7. 抗性的遗传

多数 *CP* 基因的工程植物，其 *CP* 基因在 R1 和 R2 代按孟德尔定律分离，如转 TMV－*CP* 基因的烟草，其后两代基因按 3∶1 分离。转 ALMV－*CP*、CMV－*CP* 等基因的烟草也是如此，*CP* 基因是一个位点显性遗传。但有些转 ALMV－*CP* 基因的烟草 R1 代按双位点显性遗传，以 15∶1 分离。有的转 *CP* 基因的植物，在 R1 和 R2 代形成致死表型配子，其 *CP* 基因是以 1∶1 比例分离。此外，还有 *CP* 多拷贝插入，其遗传都不符合上述规律。

目前，在各种植物抗病毒基因工程策略中，利用病毒外壳蛋白基因的方法是最为成熟的。有些转 *CP* 基因的植物已经过大田试验并推广，它们对相应病毒的侵染都表现了良好的抗性，如北京大学转化 TMV－*CP* 的 PK－873 香料型烟草，已在我国烟草生产区大面积推广。利用转病毒 *CP* 基因所得的植物也是最安全，因为外壳蛋白本身没有毒性，到目前为止，它的副作用尚未发现。但如果某种病毒的外壳蛋白，能够包被虫传的其他病毒 RNA，也许会发生危险，庆幸的是至今还未发现这种情况的存在。

利用病毒外壳蛋白基因构建抗病毒的策略在抗芜菁花叶病毒的基因工程上也得到应用。最早 Jan（1999）把 TuMV 分离物 ESC8 的 *CP* 基因转入本氏烟，结果发现一些抗性植株在 TuMV 侵染的早期在嫩叶上出现轻花叶，但花叶症状随这些叶片展开而消失，Jan 等认为这种抗性机理是由 RNA 介导的转录后基因沉默（post transcription gene silencing，PTGS）。若把 TuMV *CP* 基因与 TSWV（*Tomato spotted wilt virus*，TSWV）218bp 的 *N* 基因融合一起转化本氏烟，转基因植株表现出对两种病毒的抗性，实验结果表明病毒多片段融合可表现出由 PTGS 诱导的对多种病毒的复合抗性（Jan *et al.*，2000）。Lehmann 等（2003）和 Dunoyer 等（2004）通过转 TuMV*CP* 和 *VPg* 基因来研究转基因沉默和基因互作。卢爱兰等（1996）用农杆菌介导的叶盘转化法，将 TuMV *CP* 基因导入甘蓝型油菜，获得抗 TuMV 转基因油菜。万萌等

（1995）也做了类似的工作。而朱常香等（2001）将 TuMV *CP* 基因导入大白菜，获得抗病的转基因大白菜。罗静等（2007）构建了 TuMV *CP* 基因的反向重复表达载体，利用农杆菌介导法将其导入菜心，获得阳性转化植株，为抗 TuMV 育种提供了一条新途径。

二、利用弱病毒全长 cDNA

植物病毒株系间存在干扰现象，即弱毒株可保护植物避免强毒株的侵染。从 20 世纪 70 年代以来，欧洲、日本及中国等利用病毒弱毒株防治由烟草花叶病毒（TMV）引起的番茄花叶病毒病，取得增产防病效果。1987 年，山谷纯等首次将 TMV 弱株系的全长 cDNA 转化烟草，得到抗 TMV 的烟草植株。弱病毒全长 cDNA 的抗病毒基因策略，是根据植物病毒株系间交叉保护原理而设计的。转入植物内的弱病毒全长 cDNA 可翻译出抗强毒株的弱病毒颗粒，保护了植物。以此方法得到的转基因植株，在另外病毒混合侵染后，可能产生复合症状，加重病症。cDNA 转录产物弱病毒也可能成为其他植物的侵染源。若此策略在生产实践中应用，其稳定性则有待提高。张海燕等（1998）用激光微束穿刺法，将商陆抗病毒蛋白基因的 cDNA 导入甘蓝型油菜，获得抗 TuMV 的转基因植株。

三、利用病毒卫星 RNA

病毒卫星 RNA 是类依赖于辅助病毒才能复制的低分子量的 RNA，它不能编码外壳蛋白，只装配于辅助病毒的外壳蛋白中。病毒卫星 RNA 与辅助病毒竞争由辅助病毒诱导的复制酶和其编码的外壳蛋白。卫星 RNA 复制快，合成效率高，从而抑制了辅助病毒的复制和合成。未包装的卫星正链 RNA 与合成的负链形成稳定的卫星双链 RNA，在组织中积累。病毒卫星 RNA 可改变由辅助病毒引起的寄主植物病症，常被认为是病毒分子寄生物。1986 年，Baulcomb 等首次把黄瓜花叶病毒（CMV）卫星 RNA 的

cDNA 转化烟草。再生的转基因植株接种 CMV 后，只在 1～3 片叶上形成斑驳，并有大量卫星 RNA 产生，对照则发病严重。Gerlach（1987）利用烟草环斑病毒的卫星 RNA 基因转化烟草，获得对该种病毒的抗性。国内田波领导的研究小组（1989，1990）利用 CMV 卫星 RNA 的 CDNA 转化烟草、番茄、甜椒均获得成功。由此可见，病毒卫星 RNA 的转录产物能被病毒复制体系识别、复制和加工，复制产生的大量卫星 RNA 有效地抑制病症的发展。

转基因植物由利用病毒卫星 RNA 而获得保护作用具有后效性与持久性，且不受侵染病毒浓度影响。但它不能彻底抑止辅助病毒的侵染，只有少数病毒有卫星 RNA；并且突变率比较高，具有减轻症状作用的卫星 RNA 一旦发生突变会加重病害症状。维持抗性稳定性，降低突变率，这是病毒卫星 RNA 策略推广使用的关键。

四、利用病毒反义 RNA

基因转录时，双链 DNA 中一条有意义链（正链）转录成 RNA，另一条无意义链（负链）转录成反义 RNA。反义 RNA 核酸顺序与 RNA 互补，它可阻断病毒组重要序列的表达，抑制病毒的侵染。反义 RNA 对基因表达调控发生在翻译起始水平，也可在复制和转录水平上。调控是通过 RNA 之间的氢键，通过 RNA－RNA（或 DNA－RNA）相互作用实现的。反义 RNA 与 mRNA 的序列和二级结构决定了作用的专一性和强度。

反义 RNA 的发现启示人们构建人工反义基因与反义 RNA 系统，用来抑制植物或病毒基因的表达。已有实验表明人工反义 RNA 对真核及原核生物具有负调控作用。

（一）反义 RNA 介导的抗 DNA 病毒

DNA 病毒有一个 DNA 转录成 RNA 的核期，这与 mRNA 的情况相似，因此反义 RNA 对这类病毒有一定抑制作用。Day 等于 1991 年首次报道了表达双生病毒科番茄金黄色花叶病毒（TG-

MV）的 AL1 基因的反义 RNA 时，能有效地抑制了 DNA 病毒 TG-MV 的复制。转基因植物对同科的甜菜曲顶病毒（BTCV）也有一定的抗性，但对非洲木薯花叶病毒（ACMV）则没有抗性。基因组序列分析表明病毒与反义 RNA 作用区域同源性必须超过一定的阈值才能形成双链。反义 RNA 策略有希望成为防治 DNA 病毒的有效方法。

（二）反义 RNA 介导的抗单链 RNA 病毒

1986 年，Rezaian 等首次报道黄瓜花叶病毒（CMV）的卫星 RNA 中的反义 RNA，可与 CMV 的外壳蛋白基因 RNA3 和 RNA4 结合，阻止了病毒外壳蛋白的合成。目前，由该策略而获得转基因植物，有分别抗 CMV、PVX、PVY、TEV 的烟草，以及抗 TEV 的甜瓜和抗 PLRV 的马铃薯等。国外有人甚至将人工合成的病毒外壳蛋白的反义 RNA 转化植物，获得表达的外壳蛋白反义 RNA 的烟草，其中包括转 ALMV、CMV、PVX、PLRV 和豇豆花叶病毒（CpMV）等的 *CP* 反义 RNA，它们对相应病毒也表现一定的抗性。利用反义 RNA 所获得的转基因植物，其抗性还不太理想，一般只有在接种低浓度病毒时才有抗性，接种高浓度病毒时抗性消失。

研究表明应用反义 RNA 技术来防治植物 DNA 病毒比 RNA 病毒成功。这与双螺旋 RNA 的构象以及反义基因对应基因组 RNA 或非基因组 RNA 的区域有关，可以采用一些策略来提高对 RNA 病毒的抗性，如优化反义 RNA 与靶 RNA 的结合，延长反义 RNA 的半衰期，在细胞质中表达反义 RNA 等方法。

五、利用病毒复制酶基因

植物 RNA 病毒的复制酶是依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase，RdRp），是病毒基因组编码的自身复制不可缺少的部分，特异地合成病毒的正、负链 RNA。复制酶基因是病毒非结构蛋白基因，一般是在病毒核酸进入寄主细胞并结合到寄主核糖体之后形成的。复制酶介导抗性机理主要是

复制酶基因干扰病毒的复制，其抗性特点包括：

①抗性强，对完整的病毒粒子和裸露的病毒 RNA 都具有高度抗性或免疫，对高剂量接种也有抗性。

②抗性持续时间长，寄主整个生活史不发病。

③抗性水平与整合到染色体上的基因拷贝数无关。

④抗性具有明显的株系专化性，只对亲本病毒株系有抗性。

目前复制酶介导的抗性倍受人们的关注。1990 年 Golemboski 将 TMV U1 株系编码的复制酶基因的部分序列，即 54KD 蛋白基因导入烟草，得到的植株对 TMV 表现很强的抗性，比一般转外壳蛋白基因的植株的抗病性高得多，这是首例复制酶介导的病毒抗性。用复制酶基因获得的抗性对马铃薯 Y 病毒属、烟草脆裂病毒属、黄瓜花叶病毒属和烟草花叶病毒属的病毒都有较好的效果，利用该策略获得的转基因植物有烟草，分别抗 CMV、PVX、PVY、TMV、建兰环斑病毒（CyRSV）和豌豆早枯病毒（PEBV）。目前已在 13 种病毒（分属 10 个植物病毒属）中进行研究，除复制酶中 54KD 蛋白介导的抗性外，缺陷型复制酶蛋白也可介导病毒抗性，如 PVY 的核内含体 b（NIb）蛋白中存在 GDD 基元序列，被认为是 PVY 复制酶复合物的核心组成部分。

六、利用病毒移动蛋白基因

植物病毒在细胞间的传递，需转移基因的产物——移动蛋白参与。移动蛋白（movement protein，MP）由病毒基因编码，负责参与病毒在宿主细胞之间传递和通过植物维管组织长距离迁移，而导致宿主系统发病。若干扰或抑制移动蛋白的功能，就可阻断病毒侵染。日本大学的研究小组发现：3A 蛋白担负了病毒增殖后，在细胞间扩散与转移的功能。把 CaMV35S 启动子下游区逆向连接到 3A 蛋白基因 cDNA 反义载体上，转入细胞，得到的烟草植株接种高浓度的 CaMV 病毒，未出现病症。MP 介导的抗性特点是只有当转基因植株表达的是失去功能的 MP 时，才能显示出抗性。转基因表达的失去功能的 MP 与接种病毒的野生型

MP竞争胞间连丝上的结合位点。MP影响病毒在胞间的扩散和转移，因此抗性通常表现在病毒侵染的中晚期，而对病毒的早期侵染没影响。由于MP基因介导的抗性是广谱性的，因而将具有广阔的应用前景。

七、利用核糖体失活蛋白基因

核糖体失活蛋白（ribosome-inactivating Protein. RIP）广泛存在于高等植物中，且含量丰富。RIP是一类能抑制蛋白质生物合成的蛋白质，选择性作用于60s核糖体大亚基，抑制肽链延伸。大多数植物和细菌中的RIP通过其N—糖苷酶活性抑制蛋白质合成，而真菌中的RIP则以其核酸酶活性抑制蛋白质合成。

美国Monsanto公司的研究人员发现，美洲商陆叶和种子中的RIP，即商陆抗病毒蛋白（Pokeseed antiviral protein，PAP），具有抗植物和动物病毒的活性。他们将PAP基因转入烟草和马铃薯，获得的转基因植株在PAP初期低表达水平时就可防止病毒侵染。

药用植物栝楼中的天花粉蛋白（trichosanthin，TCS）是一种核糖体失活蛋白，可抑制其蛋白质合成，TCS具有广谱抗植物病毒的活性。姜国勇等将TCS基因转入番茄，获得了抗TMV、CMV的转基因番茄株系。

八、利用抗体基因和干扰素基因

抗体能与病毒起反应，若将抗病毒的中和抗体基因转入植物，使其在体内表达中和抗体以封闭病毒颗粒。1989年，Hiatt等首次将鼠杂交瘤mRNA的cDNA转化烟草，将表达单个k或r免疫球蛋白链的植物杂交，产生的后代得到完整有免疫活性的抗体。已有多个实验表明，动物的抗体基因转入植物后可表现出对植物病毒的抗性。

动物细胞受病毒感染后可合成并分泌干扰素。干扰素是一类相对分子质量小的蛋白质，它能活化细胞中的寡核苷酸合成酶、核酸内切酶和激酶，阻断蛋白质的合成，从而发挥对病毒的广谱

抗性。芬兰的研究人员将大鼠中编码干扰素寡腺苷酸合成酶基因导入马铃薯，转基因的马铃薯植株表现出对 PVX 的抗性。目前已有报道干扰素基因在烟草和水稻中获得表达，也表现出一定的抗性。

九、利用核酶

核酶（Ribozyme）是类有特殊二级结构、能特异性催化切割其他 RNA 分子的小分子 RNA，它常存在于一些病毒卫星 RNA 中。天然的核酶可在多位点上特异性切割 RNA，由单独性底物和催化性 RNA 进行。它对序列要求仅是底物上的 3 个核苷酸。利用这个特性，可设计合适的核酶结构，转化植株，使其特异性切割病毒的核酸，阻止病毒复制。Edington 等首次设计出可酶切烟草原生质体中 TMV－RNA 的核酶，它把 TMV 上的 RNA 聚合酶编码区一分为二。该核酶本身侧链 40 个核苷酸，与酶切位点周围的 TMV 序列互补，防止了病毒的复制。许政皑等还设计了以 TMV 移动蛋白（MP）基因为靶的核酶，实验结果表明，核酶能有效切割 MP 基因，抑制病毒扩散。核酶两臂需与靶 RNA 的碱基配对，故可认为核酶是有催化活性的反义 RNA 分子，它使靶内的一个磷酸二酯键断裂，直接破坏了靶 RNA 的生物功能，因此说核酶比反义 RNA 抗病毒的作用更优越。但它也存在一定的危险性，核酶也有可能将生物体内有用的 RNA 作为靶进行切割，破坏正常细胞的生理功能。

十、利用与昆虫介体传播相关的基因

植物病毒主要通过昆虫、真菌、线虫等传播。病毒介体专化性与病毒基因产物有关。TEV 编码被称作蚜传辅助成分（helper componcnt，HC）的 56k 蛋白的 HC 基因的是蚜虫传毒所必须的。花椰菜花叶病毒基因组也编码一个 18K 与该病毒的蚜传有关的蛋白称为蚜传因子（aphidtransmission factor，ATF）。如果封闭 HC 和 ATF 基因的表达，就使这些病毒不能由蚜虫传播，这样就达到

控制病毒传播的目的。

十一、利用植物体内的抗病毒基因

植物面临病虫害的侵染，往往会产生一些抗性物质，以提高自身防御能力，如植保素、过氧化酶、几丁质酶、溶菌酶、β-1、3-内葡聚糖酶、植物抗毒素、富含羟脯氨基蛋白以及病原相关蛋白（PR）等。把这些基因分离，用于抗病毒的植物基因工程，有望提高植物抗病性。日本的大桥佑子发现抗 TMV 的烟草品种 PR 含量较高，并成功克隆了烟草感染 TMV 诱导产生的 PR 蛋白的 cDNA。将 PR 蛋白基因导入作物，可用于植物的抗病育种。在烟草上还发现另一类抗性蛋白质：抗病毒因子（AVF）和病毒复制抑制物，它们与动物干扰素十分相似，对病毒侵染或增殖有显著的抑制，可能在烟草抗病毒机制的最后步骤中发挥作用，而 PR 蛋白可能涉及中间一些过程。近年来，植物抗病基因的克隆也取得重大进展。目前，科学家们已克隆到多个植物抗病基因，其中烟草的 N 基因，它编码的蛋白有 1 144个氨基酸，对烟草花叶病毒（TMV）有明显的抗性。随着分子生物技术的不断发展，我们将获得更多的植物抗病毒基因，通过基因工程方法可构建出更多的工程植株，获得更广泛、安全和稳定的抗性。

由于植物抗病毒的反应是个复杂体系，植物编码的抗性基因难于被分离和转移。至今，利用来源植物的抗性基因构建抗病毒基因工程还尚处于探索阶段。一旦成功，必将是最佳策略之一，因为这种转基因植物的危险性最小。总之，转基因植物的抗性有待增强和稳定，抗性范围有待扩大。随着科学实验手段的日新月异，植物抗病毒基因工程的策略也将不断发展。

主要参考文献

[1]《雪菜病毒病成灾流行规律及综合防治技术研究》项目总结

[2] 洪健，李德葆，周雪平主编．植物病毒分类图谱．北京：科学出版社，2001

[3] 杨新美主编．植物生态病理学．北京：中国农业科技出版社，2000

[4] 裘维蕃主编．植物病毒学．科学出版社，1985

[5] 叶培根，唐爱章，江冬青，周书军，周宏等编著．雪菜．北京：中国农业科技出版社，2002

[6] Aparicio F，Myrta B，Terlizzi B，Pallas V. Molecular variability among isolates of prunus necrotic ringspot virus from different *Prunus* spp. Phytopathology. 1999，89：991 ~ 999

[7] Basso J，Dallaire P，Charest PJ，Devantier Y，Laliberte JF. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5′ non-translated region of turnip mosaic *potyvirus* RNA. J Gen Virol. 1994，75（11）：3 157 ~ 3 165

[8] Berger PH，Pirone TP. The effect of helper component on the uptake and localization of *potyvirus* in *Myzus persicae*. Virology. 1986，153：256 ~ 261

[9] Blanc S，Ammar ED，Sandra GL. Mutations in the *potyvirus* helper component protein：effects on interactions with virions and aphid stylets. J Gen Virol，1998，79：3 119 ~ 3 122

[10] Chen J，Chen JP，Adams MJ. Variation between turnip mosaic virus isolates in Zhejiang Province，China and evidence for recombination. Journal of Phytopathology. 2002，150：142 ~ 145

[11] Dallot S，Quiot-Douine L，Saenz P，Cervera MT. Identi-

fication of *Plum pox virus* determinants implicated in specific interactions with different Prunus spp. Phytopath. 2001, 91: 159 ~ 164

[12] David WT, Purification and characterization of *potyvirus* helper component. Virology. 1985, 144: 260 ~ 267

[13] Desbiez C, Scheibel C, Granier F, Robaglia C, Delaunay T, Lecoq H. Biological and molecular variability of zucchini yellow mosaic virus on the island of Martinique. Plant disease. 1996, 80: 203 ~ 207

[14] Dietzgen R G, Sander E. Monoclonal antibodies against a plant virus. Arch Virol. 1982, 74: 197 ~ 204

[15] Dombrovsky A, Huet H, Chejanovsky N, Raccah B. Aphid transmission of a *potyvirus* depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. Arch Virol. 2005, 150 (2): 287 ~ 298

[16] Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. Annual Reviews of Microbiology. 1997, 51: 151 ~ 178

[17] Dreher TW. Functions of the 3′-untranslated regions of positive strand RNA viral genomes. Annual Reviews of Phytopathol. 1999, 37: 151 ~ 174

[18] Dunoyer P, Thomas C, Harrison S, Revers F, Maule A. A cysteine-rich plant protein potentiates *Potyvirus* movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. Virology. 2004, 78 (5): 2 301 ~ 2 309

[19] Duprat A, Caranta C, Revers F, Menand B, Browning KS, Robaglia C. The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso) 4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to *potyvirus*es. Plant J. 2002, 32 (6): 927 ~ 934

[20] Edwardson JR, Christie RC, Ko NJ. *Potyvirus* cylindrical inclusion subdivision-IV. Phytopathology. 1984, 74: 1 111

[21] Fellers J, Wan J, Hong Y. In vitro interactions between a

potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. J Gen Virol. 1998, 79: 2 043 ~ 2 049

[22] Green SK, Deng TC. Turnip Mosaic Virus strains in Cruciferous host in Taiwan. Plant Disease. 1985, 69: 28 ~ 31

[23] Halk EL, Hsu HT, Aebig J, Franke J. Production of monoclonal antibodies against three ilarviruses and alfalfa mosaic virus and their use as serotyping reagments. Phytopathology. 1984, 74: 367 ~ 372

[24] Hancock JM, Chaleeprom W, Dale J, Gibbs A. Replication slippage in the evolution of *potyviruses*. J Gen Virol. 1995, 76: 3 229 ~ 3 232

[25] Harrison BD. Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. Euphytica. 2002, 124: 181 ~ 192

[26] Horsewood P. Characterization of a monoclonal antibody to Turnip Mosaic Virus and its use in immunodiagnosis of infection. Phytoprotection. 1991, 72: 61 ~ 68

[27] Hughes SL, Green SK, Lydiate DJ, Walsh JA. Resistance to Turnip Mosaic Virus in *Brassica rapa* and *B. napus* and the analysis of genetic inheritance in selected lines. Plant Pathology. 2002, 51 (5): 567 ~ 570

[28] Hughes SL, Hunter PJ, Sharpe AG, Kearsey MJ, Lydiate DJ, Walsh JA. Genetic mapping of the novel Turnip mosaic virus resistance gene TuRB03 in Brassica napus. Theor Appl Genet. 2003, 107 (7): 1 169 ~ 1 173

[29] Inoue H , Nojima H , Okayama H . High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene, 1990, 96: 23 ~ 28

[30] Jan FJ, Fagoaga C, Pang SZ, Gonsalves D. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene

silencing. J Gen Virol. 2000, 81 (8): 2 103 ~2 109

[31] Jan FJ, Pang SZ, Fagoaga C, Gonsalves D. Turnip mosaic *potyvirus* resistance in Nicotiana benthamiana derived by post-transcriptional gene silencing. Transgenic Res. 1999, 8 (3): 203 ~ 213

[32] Jenner C E, Walsh J A. Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. Plant Pathology. 1996, 45: 848 ~856

[33] Jenner CE, Keane GJ, Jones JE. Serotypic variation in Turnip mosaic virus. Plant Pathology. 1999, 48: 101 ~108

[34] Jenner CE, Sanchez F, Nettleship SB, Foster GD, Ponz F, Walsh JA. The cylindrical inclusion gene of Turnip mosaic virus encodes a pathogenic determinant to the Brassica resistance gene TuRB01. Mol Plant Microbe Interact. 2000, 13 (10): 1 102 ~1 108

[35] Jenner CE, Tomimura K, Ohshima K, Hughes SL, Walsh JA. Mutations in Turnip mosaic virus P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. Virology. 2002, 300 (1): 50 ~59

[36] Jenner CE, Wang X, Tomimura K, Ohshima K, Ponz F, Walsh JA. The dual role of the *potyvirus* P3 protein of Turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. Mol Plant Microbe Interact. 2003, 16 (9): 777 ~784

[37] Kaneko YH, Inukai T, Suehiro N, Natsuaki T, Masuta C. Fine genetic mapping of the TuNI locus causing systemic veinal necrosis by turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana*. Theor Appl Genet. 2004, 110 (1): 33 ~40

[38] Kang H, Lee YJ, Goo JH, Park WJ. Determination of the substrate specificity of turnip mosaic virus NIa protease using a genetic method. J Gen Virol. 2001, 82 (12): 3 115 ~3 117

[39] Kantrong S, Sako N. Characterization of epitopes recog-

nized by monoclonal antibodies to aphid transmissible and non-transmissible strains of turnip mosaic virus. Arch Virol. 1993, 133 (1~2): 11~20

[40] Kantrong S, Saunal H, Briand JP, Sako N. A single amino acid substitution at N-terminal region of coat protein of turnip mosaic virus alters antigenicity and aphid transmissibility. Arch Virol. 1995, 140 (3): 453~467

[41] Kasschau KD, Carrington JC. Requirement for HC-pro processing during genome amplification of tobacco etch *potyvirus*. Virology, 1995, 209: 268~273

[42] Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA unction. Dev Cell. 2003, 4 (2): 205~217

[43] Kim DH, Hwang DC, Kang BH. Characterization of Nla protease from turnip mosaic *potyvirus* exhibiting a low-temperature optimum catalytic activity. Virology. 1996a, 221: 245~249

[44] Kim DH, Hwang DC, Kang BH. Effects of internal cleavages and mutations in the C-terminal region of NIa protease of turnip mosaic *potyvirus* on the catalytic activity. Virology. 1996b, 226: 183~190

[45] Kim DH, Kang BH, Han JS, Choi KY. Temperature and salt effects on proteolytic function of turnip mosaic *potyvirus* nuclear inclusion protein a exhibiting a low- temperature optimum activity. Biochemical and Biophysical Acta. 2000, 1480: 29~40

[46] Klein PG, Klein RR, Rodriguez-Cerezo E. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. Virology. 1994, 204: 759~769

[47] Kundu AK, Ohshima K, Sako N, Yaegashi H. Cross-reactive and major virus-specific epitopes are located at the N-terminal

halves of the cylindrical inclusion proteins of turnip mosaic and zucchini yellow mosaic *potyviruses*. Arch Virol. 2000, 145 (7): 1 437 ~ 1 447

[48] Lain S, Riechmann JL, Garcia JA. RNA helicase - a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. Nuclear Acids Reviews. 1990, 18: 7 003 ~ 7 006

[49] Laliberte JF, Nicolas O, Chatal H. Release of a 22-kDa protein derived from the amino-terminal domain of the 49-kDa NIa of turnip mosaic *potyvirus* in *Escherichia coli*. Virology. 1992, 190: 510 ~ 514

[50] Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA, Carrington JC. Loss-of-susceptibility mutants of Arabidopsis thaliana reveal an essential role for eIF (iso) 4E during *potyvirus* infection. Curr Biol. 2002, 12 (12): 1 046 ~ 1 051

[51] Leonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF. Complex formation between *potyvirus* VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. J Virol. 2000, 74 (17): 7 730 ~ 7 737

[52] Leonard S, Viel C, Beauchemin C, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF. Interaction of VPg-Pro of turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly (A) -binding protein in planta. J Gen Virol. 2004, 85 (4): 1 055 ~ 1 063

[53] Liu F, Sukhacheva E, Erokhina T. Detection of potyviral nuclear inclusion b proteins by monoclonal antibodies raised to synthetic peptides. Europe Journal of Plant Pathology. 1999, 105: 389 ~ 395

[54] Martin AM, Poch HLC, Herrera DM, Ponz F. Resistance to Turnip Mosaic *Potyvirus* in *Arabidopsis thaliana*. MPML. 1999, 12 (11): 1 016 ~ 1 021

[55] McClintock K, Lamarre A, Parsons V, Laliberte JF,

Fortin MG. Identification of a 37 kDa plant protein that interacts with the turnip mosaic *potyvirus* capsid protein using anti-idiotypic-antibodies. Plant Mol Biol. 1998, 37 (2): 197 ~ 204

[56] McDonald JG, Hiebert JG. Characterization of the capsid and cylindrical inclusion proteins of three strains of turnip mosaic virus. Virology. 1975, 63: 295 ~ 303

[57] Nakashima H, Sako N, Hori K. Nucleotide sequences of the helper component-proteinase genes of aphid transmissible and nontransmissible isolates of turnip mosaic virus. Archives of. Virology. 1993, 131: 17 ~ 27

[58] Nicolas O, Laliber JF. The complete Nucleotide Sequence of turnip mosaic virus RNA. J Gen Virol, 1992, 73 (9): 2 785 ~ 2 793

[59] Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, Hamamoto T, Tomimura K, Tan Z, Sano T, Azuhata F, Walsh JA, Fletcher J, Chen J, Gera A, Gibbs A. Molecular evolution of turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. J Gen Virol. 2002, 83: 1 511 ~ 1 521

[60] Ohshima K. Accumulation of helper component/proteinase and coat protein of turnip mosaic virus in intact plants. Acta Virol. 1999, 43 (1): 31 ~ 37

[61] Paximadis M, Idris AM, Torres I. Characterization of tobacco Geminivivuses in the Old and New world. Achives of Virology. 1999, 144: 703 ~ 717

[62] Pinel A, Guessan P, Bousalem M. Molecular variability of geographically distinct isolates of rice yellow mottle virus in Africa. Achives of Virology, 2000, 145: 1 621 ~ 1 638

[63] Pirone TP, Blanc S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. Annual Review of Phytopathology. 1996, 34: 227 ~ 247

[64] Provvidenti R. Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to Turnip mosaic virus and Cauliflower mosaic virus. J Amer Soc Hort Sic. 1980: 105 (4): 571 ~573

[65] Provvidenti R. Turnip mosaic potyvius. In Viruses of Plants. 1 340 ~1 343. Edited by A. A. Brunt, K. Crabbee, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and J. Watson. Wallingford. UK: CAB International. 1996

[66] Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds). Virus taxonomy: intro- duction to the species concept in virus taxonomy, Seventh report of the inter national committee on taxonomy of viruses. San Diego, California, 2000, 92 101 ~4 495, USA

[67] Restrepo-Hartwig MA, Carrington JC. Regulation of nuclear transport of a pant *potyvirus* protein by autoproteolysis. J Virol. 1992, 66: 5 662 ~5 666

[68] Restrepo-Hartwig MA, Carrington JC. The tobacco etch *potyvirus* 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. J Virol. 1994, 68: 2 388 ~2 397

[69] Robbins MA, Witsenboer H, Michelmore RW, Laliberte JF, Fortin MG. Genetic mapping of turnip mosaic virus resistance in Lactuca sativa. Theor. Appl. Genet. 1994. 89: 583 ~589

[70] Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF. Capsid protein and helper component-proteinase function as *potyvirus* cell-to-cell movement proteins. Virology. 1997, 237: 283 ~295

[71] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed, NewYork: Cold Spring Harbor Labortary. 1989

[72] Sanchez F, Wang X, Jenner CE, Walsh JA. Ponz

F. Strains of Turnip mosaic *potyvirus* as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. Virus Res. 2003, 94 (1): 33 ~ 43

[73] Sato M, Nakahara K, Yoshii M, Ishikawa M, Uyeda I. Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *potyvirus*es. FEBS Lett. 2005, 579 (5): 1 167 ~ 1171

[74] Shattuck VL. The effect of turnip mosaic virus infection of the mineral content and storability of field-grown rutabaga. Commun Soil Sci Plan, 1989, 29: 581 ~ 595

[75] Shattuck, VI. The biology, epidemiology, and control of turnip mosaic virus. Plant Breed. Rev. 1992, 14: 199 ~ 238

[76] Shukla DD, Ward CW, Brunt AA. The Potyviridae. CAB International, Wallingford, U. K. 1994

[77] Shukla DD, Ward CW. Structure of *potyvirus* coat proteins and its application in taxonomy of *potyvirus* group. Adv Virus Res, 1989, 36: 273 ~ 314

[78] Soumounou Y, Laliberte JF. Nucleic acid-binding properties of the P1 protein of turnip mosaic *potyvirus* produced in Escherichia coli. J Gen Virol. 1994, 75: 2 567 ~ 2 573

[79] Suehiro N, Natsuaki T, Watanabe T, Okuda S. An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect Brassica spp. and/or Raphanus sativus is in its P3 protein. J Gen Virol. 2004, 85 (7): 2 087 ~ 2 098

[80] Tan Z, Gibbs AJ, Tomitaka Y, Sanchez F, Ponz F, Ohshima K. Mutations in Turnip mosaic virus genomes that have adapted to Raphanus sativus. J Gen Virol. 2005, 86 (2): 501 ~ 510

[81] Tan Z, Wada Y, Chen J, Ohshima K. Inter- and intra-lineage recombinants are common in natural populations of Turnip mosaic virus. J Gen Virol. 2004, 85 (9): 2 683 ~ 2 696

[82] Teycheney PY, Aaziz R, Dinant S. Synthesis of (-) strand RNA from the 3′ untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. J Gen Virol. 2000, 81: 1 121 ~ 1 126

[83] Tomimura K, Gibbs AJ, Jenner CE, Walsh JA, Ohshima K. The phylogeny of Turnip mosaic virus; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent "emergence" in east Asia. Mol Ecol. 2003, 12 (8): 2 099 ~ 2 111

[84] Tomimura K, Spak J, Katis N, Jenner CE, Walsh JA, Gibbs AJ, Ohshima, K. Comparisons of the genetic structure of populations of Turnip mosaic virus in West and East Eurasia Virology. 2004, 330 (2): 408 ~ 423

[85] Tomlinson, JA. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. Annual Applied Biology. 1987, 110: 661 ~ 681

[86] Walsh JA, Jenner CE. Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. Molecular plant pathology, 2002, 3 (5): 289 ~ 300

[87] Walsh JA, Rusholme RL, Hughes SL, Jenner CE, Bambridge JM, Lydiate DJ, Green, SK. Different classes of resistance to Turnip Mosaic Virus in Brassica rapa. European Journal of Plant Pathology. 2002, 108 (1): 15 ~ 20

[88] Walsh JA, Sharpe AG, Jenner CE, Lydiate DJ. Characterization of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (Brassica napus) and genetic mapping of TuRB01. Theor. Appl. Genet. 1999, 99: 1 149 ~ 1 154

[89] Wang RY, Powell G, Hardie J, Pirone TP. Role of the helper component in vector-specific transmission of *potyvirus*es. J Gen Virol. 1998, 79 (6): 1 519 ~ 1 524

[90] Wittmann S, Chatel H, Fortin MG, Laliberte JF. Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic *potyvirus* with

the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana using the yeast two-hybrid system.* Virology. 1997, 234: 84～92

[91] Word CW, Shukla DD. Taxonomy of *potyvirus*: current problems and some solutions . Intervirology, 1991, 32: 269～296

[92] Yoon HY, Choi KY, Song BD. Fluorometric assay of turnip mosaic virus NIa protease Anal Biochem. 2000, 277 (2): 228～231

[93] Yoshii H. On the strain distribution of Turnip Mosaic Virus. *Ann. Phytopath. Soc. jap* 1963, 28: 221～227

[94] 蔡丽，许泽永，陈坤荣等．芜菁花叶病毒研究进展．湖北植保，2004，5：49～52

[95] 蔡岳松，李新予，余家兰等．四川榨菜病毒病的毒原种群及其分布．西南农业学报，1991，4 (4)：99～104

[96] 蔡岳松，童南奎，曲竹蓉等．甘蓝品种（系）对芜菁花叶病毒和甘蓝黑腐病的抗性鉴定．西南农业大学学报，1990，12 (1)：19～21

[97] 曹必好，宋洪元，雷建军等．结球甘蓝抗 TuMV 相关基因的克隆．遗传学报，2002，29 (7)：646～652

[98] 曹寿椿，朱月林，黄宝健等．不结球白菜抗病育种研究Ⅱ：TuMV 抗源鉴定与筛选．南京农业大学学报，1990，13 (2)：28～32

[99] 陈集双，张耀洲，徐平等．甘蓝型油菜芜菁花叶病毒分离物 TuMVH1 的生物学研究．中国油菜，1994，16 (1)：24～28

[100] 陈庭华，陈彩霞，蒋开杰等．雪菜病毒病及其防治．植物保护，2000，26 (3)：29～31

[101] 陈庭华，陈彩霞，蒋开杰等．雪菜病毒病介体昆虫消长及防虫网覆盖试验．浙江农业科学，2000，(4)：186～188

[102] 陈再廖．芥菜病毒病成因及防治技术．温州农业科

技，1993，(3)：31 ~ 33

[103] 邓晓东，费小雯．芜菁花叶病毒外壳蛋白基因的克隆与序列分析．热带作物学报，2000，21 (1)：59 ~ 62

[104] 费小雯，邓晓东，刘志昕等．芜菁花叶病毒的分离鉴定．热带作物学报，1999，20 (4)，53 ~ 55

[105] 冯兰香，徐玲，刘佳．北京地区十字花科蔬菜芜菁花叶病毒株系分化研究．植物病理学报，1990，20：3 ~ 7

[106] 付东亚，洪健，陈集双等．芜菁花叶病毒外壳蛋白在寄主植物叶绿体中的积累及其对光系统 II 活性的影响．植物生理与分子生物学学报，2004，30：34 ~ 40

[107] 郭兴启，李向东，朱汉城等．马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的侵染对烟草叶片光合作用的影响．植物病理学报，2000，30：942 ~ 950

[108] 何庆芳，米景九．芜菁花叶病毒 (TuMV) 核酸 cDNA 的合成与克隆．遗传学报，1991，18 (6)：559 ~ 563

[109] 洪健，徐颖，黎军英等．芜菁花叶病毒 (TuMV) 侵染对寄主植物光合作用的影响．电子显微学报，2002，21：110 ~ 111

[110] 胡吉成，朱桂香，谢淑仪．白菜孤丁病毒的抗血清特性及其应用的研究．植物保护学报，1962，1 (1)：25 ~ 34

[111] 胡廷章．中国油菜芜菁花叶病毒 1 号株系的生化性质研究．西南师范大学学报，1995，20：5 ~ 10

[112] 胡稳奇，濮祖芹，许志刚等．从蚕豆上分离到芜菁花叶病毒蚜虫不传株系的鉴定．南京农业大学学报，1987，41 ~ 45

[113] 孔令洁，方荣详．芜菁花叶病毒外壳蛋白基因的克隆及植物表达载体的构建．中国科学 B 辑，1992，(4)：374 ~ 380

[114] 李丽丽，黄早花，王圣玉．华东地区油菜病毒病的毒原种类血清学诊断．中国油料，1987，4：52 ~ 55

[115] 李丽丽，王圣玉．油菜种质资源抗病毒病鉴定研究．作物品种资源，1992 (2)：32 ~ 34，42

[116] 李丽丽．油菜芜菁花叶病毒株系鉴定．中国油料，1989（2）：51～55，65

[117] 李树德主编．中国主要蔬菜抗病育种进展．北京：科学出版社，1995，11～14，30～40

[118] 李新予，蔡岳松，王彬等．酶联免疫吸附法检测四川榨菜病毒种类．中国病毒学，1992，7（3）：311～315

[119] 李新予，王彬，余家兰．芥菜品种资源对芜菁花叶病毒抗病性鉴定研究．植物保护，1992，18（2）：6～8

[120] 李彦勇．应用间接酶联免疫吸附技术对芜菁花叶病毒血清学关系的研究．植物病理学报，1984，14（4）：219～224

[121] 李烨，罗玉明．不同的萝卜品种对 TuMV 抗性的苗期鉴定．长江蔬菜，2000（12）24～26

[122] 凌立，杨演．油菜毒素病．金陵学报，1941，9（1，2）：293～304

[123] 刘秀梵．单克隆抗体在农业上的应用．合肥：安徽科学出版社，1994

[124] 刘栩平，路文长．我国十省（市）十字花科蔬菜芜菁花叶病毒（TuMv）株系分化研究．科学通报，1989，34：1 660～1 664

[125] 卢爱兰，陈正华，孔令洁等．抗芜菁花叶病毒转基因甘蓝型油菜研究．遗传学报，1996，23：77～83

[126] 路文长，刘栩平，刘志荣等．中国大白菜抗芜菁花叶病毒的抗源．科学通报，1989，20：1 577～1 579

[127] 青玲，吴建祥，戚益军等．蚕豆萎蔫病毒单克隆抗体的制备及检测应用．微生物学报，2000，40（2）：167～172

[128] 尚巧霞，韩成贵，杨莉莉．小麦黄花叶病毒的血清学检测．北京农学院学报，2002，1（2），15～17

[129] 施曼玲，李桂新，陶小荣．芜菁花叶病毒温州分离物 HC-Pro 基因序列分析．微生物学通报，2002，29（1）：26～30

[130] 施曼玲．浙江榨菜病毒病病原鉴定．微生物学通报，

2003，30（6）：51 ~ 55

［131］施曼玲．芜菁花叶病毒分离物 NBXC 的 *CP* 和 *HC-Pro* 基因克隆与序列分析．科技通报，2007，23（1）：41 ~ 45

［132］施曼玲．芜菁花叶病毒欧亚分离物 *HC-Pro* 基因的克隆和序列分析．植物病理学报，2007，37（4）：383 ~ 389

［133］施曼玲，吴建祥，郭维，周雪平．芜菁花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用．微生物学报，2004，44（2）：185 ~ 188

［134］施曼玲，周雪平．芜菁花叶病毒两分离物的 *CP* 基因及 *HC-pro* 基因的比较．浙江大学学报（农业与生命科学版），2005，31（6）：689 ~ 693

［135］施曼玲，周雪平．浙江宁波雪里蕻花叶病病原鉴定及雪里蕻品种的抗病性测定．植物病理学报，2006，36（5）：413 ~ 419

［136］史锋，于晓虹．芜菁花叶病毒州株 *HC* 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达．浙江农业学报，1999，11（2）：59 ~ 62

［137］唐爱章，叶培根．雪菜的品种类型与栽培技术．浙江农业科学，2002，（5）：259 ~ 261

［138］陶月良，杨加付，叶利勇等．温州盘菜感染芜菁花叶病毒后的生理生化性状变化．浙江农业科学，2001，1：39 ~ 41

［139］田波，裴美云．植物病毒学研究方法．北京：科学出版社，1987，505

［140］万萌，寸守铣，邱仕芳等．甘蓝型油菜双低品种抗病毒遗传转化的研究．西南农业大学学报，1995，8（2）：27 ~ 31

［141］汪谦．现代医学实验方法．北京：人民卫生出版社，1997，730 ~ 738

［142］王爱民，汪隆植．萝卜对芜菁花叶病毒抗性和叶内游离氨基酸含量的关系．植物病理学报，1991，21（3）：193 ~ 197

［143］王翠花，王洪久，王世详．山东大白菜 TuMV 株系分化研究．山东农业科学，1993，5：13 ~ 15

[144] 王述彬，袁希汉，苏小俊等．中国不结球白菜种质资源对芜菁花叶病毒的抗病性鉴定．中国蔬菜，2002（1）：11～13

[145] 魏毓堂，韦石泉．大白菜对芜菁花叶病毒（辽宁一号分离物）的抗性遗传规律研究．植物病理学报，1991，199～203

[146] 魏毓棠，赵国余，陶正平等．大白菜对芜菁花叶病毒抗性同生理生化相关性状的研究．沈阳农业大学学报，1991，22（2）：91～96

[147] 谢永俊，万洪辉．云南地方油菜种质资源抗（耐）病毒病、菌核病和霜霉病的鉴定研究．云南农业大学学报，2001，16（2）：89～92

[148] 徐均焕，李德葆，盛方镜等．不同抗性的榨菜在芜菁花叶病毒感染后细胞超微结构的研究．中国病毒学，1996，11（1）：61～68

[149] 徐立彬．大白菜对芜菁花叶病毒（TuMV）抗病性鉴定．北方园艺，1996，21～23

[150] 徐玲，冯兰香，钮心恪．中国大白菜对芜菁花叶病毒基因型株系的抗性鉴定．中国蔬菜，1990（4），15～16，45

[151] 徐平，许建平．芜菁花叶病毒杭州分离株外壳蛋白基因的序列分析．浙江农业大学学报，1994，20（5）：451～456

[152] 许建平，徐平．芜菁花叶病毒外壳蛋白 CP 基因克隆及其在大肠杆菌中的表达．浙江农业大学学报，1994，20（4）：363～368

[153] 杨峰，蔡少华，徐玲，等．分泌抗芜菁花叶病毒株系特异性单克隆抗体杂交瘤细胞的建立及抗体理化性质测定．生物工程学报，1992，8（4）：342～347

[154] 叶荣，于善谦，韦石泉．用单克隆抗体作芜菁花叶病毒不同分离物外壳蛋白抗原结构的比较研究．病毒学报，1996，12（1）：62～68

[155] 于翠，吴建祥，周雪平．番茄花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用．微生物学学报，2002，42（4）：453～457

[156] 张海燕，田颖川．将商陆抗病毒蛋白（PAP）cDNA导入油菜获得抗病毒转基因植株．科学通报，1998，43（23）：2 534～2 537

[157] 张耀洲，龚柏伟．芜菁花叶病毒杭州株 P1 基因的克隆和在大肠杆菌中的表达．应用与环境生物学报，1996，2（2）：141～146

[158] 赵荣乐，郑光宇．在新疆发生的芜菁花叶病毒的鉴定．北京师范大学学报（自然科学版），2002，38：38～42

[159] 郑岩松，放木壬，张曙光．芥蓝与菜薹种间杂交后代对 TuMV 的抗性．中国蔬菜，2003（5）：18～20

[160] 周必文．油菜病毒病流行规律与预测预报研究．病虫测报，油菜病毒流行规律与预测预报技术研究专辑，1989

[161] 周雪平，陈集双，李德葆等．马铃薯 Y 病毒组病毒的高产量提取方法建立．微生物学通报，1994，21（3）：184～186

[162] 周雪平，濮祖芹．侵染豌豆的芜菁花叶病毒研究．南京农业大学学报，1990，13：51～55

[163] 朱常香，宋云枝，张松等．抗芜菁花叶病毒转基因大白菜的培育．植物病理学报，2001，31（3）：257～263

[164] 朱培坤，陆妙康，王鸣歧等．芜菁花叶病毒在上海市郊县蔬菜等作物上分布范围的血清学测定．植物病理学报，1984，14（2）：101～106

S436.344
1

[General Information]
书名=雪菜病毒病及其防治
作者=周书军，施曼玲主编
页数=160
SS号=12183199
DX号=
出版日期=2008.05
出版社=中国农业科学技术出版社

封面
书名
版权
前言
目录
第一章　综述
第一节　雪菜的起源与分布
第二节　雪菜的主要类型特点及雪菜生产现状
第二章　植物病毒的基本特征
第一节　植物病毒研究简史
第二节　植物病毒的基本形态、结构和组成
第三节　植物病毒的复制和增殖
第三章　雪菜病毒病的诊断和病毒鉴定
第一节　植物病毒病诊断的原则和方法
第二节　芜菁花叶病毒病的诊断与病毒鉴定
第三节　宁波雪菜花叶病毒病病原的检测与鉴定
第四章　芜菁花叶病毒的特征
第一节　芜菁花叶病毒的普通生物学特征
第二节　芜菁花叶病毒的分子生物学特征
第五章　雪菜病毒的传播
第一节　雪菜病毒的介体和非介体传播
第二节　雪菜病毒的侵染途径
第三节　影响雪菜病毒侵染的因素
第四节　雪菜受病毒侵染后的变化
第六章　选育并推广抗（耐）病品种
第一节　品种对病毒的抗性
第二节　育种目标与育种方式
第三节　强耐雪菜病毒病品种选育案例
第七章　综合防治雪菜病毒病的其他措施
第一节　切断传毒媒介
第二节　适当推迟播期，避开蚜虫危害高峰
第三节　改进栽培管理，改善生态环境

第四节　采用积极的、物理的及化学的防治方法
第五节　应用雪菜抗病毒基因工程
主要参考文献